

Aus der 2. medizinischen Klinik
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Matthias Ebert

Die Interaktion des Kernrezeptors PPAR γ mit der Lipidphosphatase MTMR7 im
kolorektalen Karzinom

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Philip Weidner

aus
Heidelberg
2016

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Matthias Ebert

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	1
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG.....	7
1.1 Die Karzinogenese im kolorektalen Karzinom.....	7
1.2 Ras Mutationen	10
1.3 PPAR γ – Einleitung und allgemeine Funktionsweise.....	10
1.3.1 Physiologie.....	11
1.3.2 Liganden.....	13
1.3.3 Regulation & posttranslationale Modifikation	15
1.4 Myotubularin Related Protein 7	17
1.4.1 Der PI3K-Signalweg.....	17
1.4.2 Myotubularine	20
2 MATERIAL UND METHODEN	27
2.1 Material	27
2.1.1 Zelllinien.....	27
2.1.2 Reagenzien.....	27
2.1.3 Antikörper.....	28
2.1.4 Kits	28
2.1.5 Gerätschaften	29
2.1.6 Software.....	29
2.1.7 Zellkultur.....	30
2.1.8 Versuchstiere	30
2.1.9 Zellkultur.....	30
2.1.10 Nukleinsäurenachweis und Klonierung.....	31
2.1.11 Beeinflussung von EGF- & Insulin-assoziierten Signalkaskaden, Zellwachstum und Dosis-Wirkungs-Analysen	35

2.1.12	Analyse des Insulin- und EGFR vermittelten PI3K- und ERK-Signaltransduktion	36
2.1.13	Immunhistochemie.....	38
2.1.14	Statistische Auswertung und Normalisierung	38
3	ERGEBNISSE	40
3.1	MTMR7 Nachweis in murinen und humanen Geweben	40
3.1.1	Insulinresistenz beeinflusst die Expression von MTMR7-mRNA in murinem Gewebe.....	42
3.2	Die Beeinflussung EGF- und Insulin-aktivierter Signalkaskaden durch MTMR7	42
3.2.1	Charakteristika der verwendeten Zellsysteme.....	42
3.2.2	MTMR7 hemmt die EGF-vermittelte Aktivierung der AKT-mTOR-Kaskade ...	44
3.2.3	Der PPAR γ -Ligand Rosiglitazone verstärkt die MTMR7-abhängige Hemmung der EGF-aktivierten AKT-mTORC-Kaskade	47
3.2.4	MTMR7 hemmt die Insulin-vermittelte Aktivierung der AKT-mTOR-Kaskade	50
3.2.5	MTMR7 hemmt die EGF- und Insulin-aktivierte ERK1/2-Signalkaskade	52
3.2.6	Die Effektstärke der MTMR7-Transfektion unterscheidet sich zwischen den beiden kolorektalen Karzinomzelllinien.....	56
3.2.7	MTMR7 hemmt die „nicht-genomische“ PPAR γ -Liganden-vermittelte Aktivierung von ERK	57
3.2.8	MTMR7-Überexpression führt zu einem Anstieg des zellulären HSP90-Gehalts in HEK293T-Zellen, jedoch nicht in den beiden kolorektalen Karzinomzelllinien.	58
3.2.9	MTMR7 hemmt den PPAR γ -Agonist-vermittelten Anstieg des zellulären HSP90-Gehalts.....	59
3.3	MTMR7 reduziert das Zellwachstum kolorektaler Karzinomzelllinien mit Mutationen des Ras- und WNT-Signalwegs	60
3.3.1	MTMR7 mindert das Zellwachstum unter hyperinsulinämischen Bedingungen	61
3.3.2	MTMR7 mindert das Zellwachstum in transient transfizierten HCT116-Zellen unter Einwirkung von Rosiglitazone	63
3.4	MTMR7 beeinflusst die Chemosensitivität MSI- und MSS-kolorektaler Karzinomzelllinien.....	64
3.5	Analyse der MTMR7-Expression im humanen kolorektalen Karzinom.....	68
3.5.1	MTMR7-Verlust ist ein häufiges Ereignis im humanen kolorektalen Karzinom und korreliert mit der Dedifferenzierung der Tumore	68
3.5.2	Die Identifikation zweier Risikogruppen für MTMR7-Verlust:	69

3.5.3	Datenbankrecherche für MTMR7-Mutationen in humanen soliden Tumoren	71
4	DISKUSSION.....	74
4.1	Methodenkritik.....	74
4.2	Die MTMR7/PPAR γ -Interaktion: Erklärungsansatz und Modellvorstellung.....	75
4.3	MTMR7 – Expression, Funktion und Regulation	79
4.4	MTMR7 im Kolorektalen Karzinom	84
4.5	MTMR7 und Diabetes.....	86
4.6	Offene Fragen und Ausblick	87
5	LITERATURVERZEICHNIS	90

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

ABBILDUNG 1. Adenom-Karzinom-Sequenz und typische Mutationen im Rahmen der Karzinogenese im kolorektalen Karzinom.	8
ABBILDUNG 2. Der Mechanismus der PPAR γ -Aktivierung:	11
ABBILDUNG 3. Die Proteinstruktur des Kernrezeptors PPAR γ	12
ABBILDUNG 4. Der Phosphatidylinositol-Metabolismus.....	18
ABBILDUNG 5. Der schematische Aufbau der Proteine der Myotubularin-Familie. 20	
ABBILDUNG 6. Subzelluläre Lokalisation, aktive und inaktive Mitglieder der Myotubularin-Familie und Komplexbildung.	22
ABBILDUNG 7. MTMR7-Expression in murinen und humanen Gewebeproben sowie in humanen kolorektalen Karzinomzelllinien	41
ABBILDUNG 8. Basales AKT-Phosphorylierungsniveau des Serinrests 473. und Vergleich der beiden kolorektalen Karzinomzelllinien ohne MTMR7-Transfektion mit der Zelllinie HEK293.	43
ABBILDUNG 9. Das basale Phosphorylierungsniveau der beiden Zelllinien mit dem höchsten Maß an AKT-Aktivierung ist nach MTMR7-Überexpression signifikant vermindert.	44

ABBILDUNG 10. Die MTMR7-Überexpression vermindert den RTK-vermittelten Anstieg der AKT(S473)-Phosphorylierung.....	45
ABBILDUNG 11. MTMR7-Überexpression führt zu einer signifikant verminderten Phosphorylierung des THR308-Rests des AKT-Proteins.	46
ABBILDUNG 12. : MTMR7-Überexpression führt zu einer konsistent verminderten Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins.....	47
ABBILDUNG 13. Eine sechzigminütige Vorbehandlung mit Rosiglitazone führt zu einer Verstärkung der MTMR7-assoziierten Effekte auf die PI3K-vermittelte Signalkaskade.	50
ABBILDUNG 14. MTMR7 hemmt die Insulin-vermittelte AKT-Aktivierung.....	51
ABBILDUNG 15. MTMR7 hemmt die Insulin-vermittelte Phosphorylierung des ribosomalen S6-Proteins in kolorektalen Karzinomzelllinien.....	52
ABBILDUNG 16. Basales ERK1/2 Aktivitätsniveau der drei untersuchten Zelllinien im Vergleich.....	53
ABBILDUNG 17. MTMR7-Überexpression führt zu einer signifikant verringerten ERK1/2-Phosphorylierung nach Insulinstimulation.....	54
ABBILDUNG 18. Präinkubation mit Rosiglitazone verstärkt die MTMR7-Vermittelte Hemmung der ERK 1/2 Phosphorylierung nach Insulinstimulation.	55
ABBILDUNG 19. Die Effektstärke der MTMR7-Transfektion ist in SW480-Zellen signifikant größer als in der Zelllinie HCT116.....	56

ABBILDUNG 20. MTMR7 hemmt die Rosiglitazone vermittelte ERK1/2 Aktivierung.....	58
ABBILDUNG 21. MTMR7-Überexpression und Rosiglitazonebehandlung verändern das HSP90 Proteinexpressionsniveau in HEK293T- und den beiden kolorektalen Zelllinien.....	60
ABBILDUNG 22. MTMR7-Überexpression führt zu einer signifikanten Verminderung der Proliferationsrate der beiden kolorektalen Zelllinien.	61
ABBILDUNG 23. MTMR7-Überexpression führt zu einer Verminderung des Zellwachstums unter hyperinsulinämischen Bedingungen.	62
ABBILDUNG 24. Die MTMR7-Überexpression führt zu einer Verminderung des Zellwachstums unter hyperinsulinämischen Bedingungen.....	63
ABBILDUNG 25. MTMR7 hemmt die durch RAS und PI3KCA vermittelte Resistenz gegenüber dem mTORC-Inhibitor Everolimus in der Karzinomzelllinie HCT116.	65
ABBILDUNG 26. : Die zusätzliche Behandlung mit Rosiglitazone führt zu einer Verstärkung des chemotherapeutischen Effekts unabhängig vom MTMR7-Status.....	66
ABBILDUNG 27. MTMR7-Überexpression reduziert die Chemoresistenz der Zelllinie HCT 116 gegenüber Cisplatin und imitiert den Effekt einer Behandlung mit dem mTORC-Inhibitor Everolimus.....	68
ABBILDUNG 28. MTMR7-Protein und mRNA-Expression im humanen kolorektalen Karzinom.	70

ABBILDUNG 29. Mutationsraten des MTMR7 Gens.....	71
ABBILDUNG 30. Veränderungen des MTMR7-Gens sind mit einem signifikant verringerten Gesamtüberleben von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom assoziiert.....	72
ABBILDUNG 31. Die MTMR7-PPAR γ -Interaktion.. ..	77
ABBILDUNG 32. MTMR7 hemmt die Ras- und PI3K-vermittelte AKT-Signalkaskade.....	81
ABBILDUNG 33. MTMR7 hemmt zentrale Aspekte der MAPK- und AKT-assoziierten Signalkaskaden.....	83

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5FU	5-Fluoruracil
aFAP	attenuierten familiären adenomatösen Polyposis
APC	Adenomatous Polyposis Coli
AUC	Area under the Curve
Bcl	B-cell Lymphoma
bp	Basenpaare
Cdk	Cyclin-dependent kinase
CIMP	CpG island methylator phenotype
CIN	Chromosomale Instabilität
CPA	Cyclic Phosphatidic Acid
CpG-Inseln	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Inseln
CRC	Kolorektale Karzinomzelllinien
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR	Epidermal Growth Factor
ERK	Extracellular-signal-regulated-Kinase
EV	Leervektor
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanine-nucleotide Exchange Factor
HAT	Histon-Acetyl-Transferase
HDAC	Histon-Deacetylase
hMLH1	humane MutL Homolog 1
HSP90	Heat-Shock-Protein 90
IGF	Insulin-like Growth Factor
IGF2R	Insulin-like Growth Factor 2 Receptor
kD	Kilodalton
LDL	Low Density Lipoproteinen
LOH	Loss of heterozygosity
LOI	Loss of Imprinting
MAPK	Mitogen-activated Proteinkinase
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MTM	Myotubularin
MTMR	Myotubularin-Related-Protein
mTOR	mechanistic Target of Rapamycin
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKD1	Phosphoinositide-dependent Kinase 1
PH-GRAF	Pleckstrin-Homology-Glucosyltransferase Rab-like GTPase Activator
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI3KC3	Phosphoinositid-3-Kinase Klasse 3
PPAR γ	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor- γ

PPRE	PPAR Response Element
PtdIns	Phosphatidylinositol
PTP	Protein-Tyrosin-Phosphatase
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Rat sarcoma
RID	Rac-Induced-Recruitment-Domäne
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SID	Set-Interaction-Domäne
T2DM	Diabetes mellitus Typ 2
XOR	Xanthin-Oxidoreduktase

1 EINLEITUNG

Maligne Neoplasien und kardiovaskuläre Erkrankungen sind nicht nur die Haupttodesursachen in Deutschland[2] und den reichen Industrienationen, in beiden Fällen trägt der metabolische und inflammatorische Status des Organismus ebenso zur Pathogenese bei wie die individuelle genetische Prädisposition. In diesem Zusammenhang kommt dem kolorektalen Karzinom aus zwei Gründen eine besondere Rolle zu: Zum einen ist es aus epidemiologischer Sicht als zweithäufigste Krebstodesursache beim Mann und dritthäufigste bei der Frau von Bedeutung[3]. Zum anderen ist es diejenige der häufigen Krebsarten, bei der Übergewicht[4] und diät-assoziierte Faktoren, wie Kalorienaufnahme, Fleisch- und Fettkonsum, als ätiologische Momenta von besonderer Bedeutung sind[5].

Auf zellulärer Ebene ist es die Dysbalance zwischen Zellwachstum und Differenzierung fördernden und hemmenden Signalkaskaden, die letztlich über Tumorentstehung und Krankheitsverlauf sowie auf dem Weg zur personalisierten Medizin über Therapieansprechen und Versagen entscheidet.

Der Kernrezeptor Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor- γ (PPAR γ) bildet mit seiner zentralen Rolle in der Fett- und Glucosehomeostase eine Schnittstelle zwischen Lebensstil, Metabolismus und Entzündung einerseits und, über seinen regulatorischen Einfluss auf genomische und nicht-genomische funktionelle Aspekte von in zahlreichen Malignomen veränderte intrazellulären Signalkaskaden, auf Karzinogenese und Tumorprogression andererseits. Insbesondere die enge Verbindung mit der Ras-Raf-MAPK-vermittelten Signalkaskade[6-8] macht den Kernrezeptor zu einem auch therapeutisch interessanten Ansatzpunkt, stellen aktivierende Mutationen der an ihr beteiligten Faktoren doch einerseits karzinogene Ereignisse und andererseits starke negativ-prädiktive Faktoren für das Ansprechen auf eben diese Kaskade abzielende zielgerichtete Therapien dar[9,10]. Ein kritisches Ereignis in Bezug auf die Regulation des Rezeptors ist hierbei die Ausbildung von Komplexen zwischen PPAR γ und an der Transkription beteiligten Kofaktoren sowie Proteinen der EGF-vermittelten Signalkaskaden[6,8,11], die nicht nur Einfluss hat auf die genomische Aktivität des Rezeptors selbst sondern gleichzeitig das Aktivierungsniveau der oben genannten Signalkaskaden verändert[12-14].

Ziel der nachfolgenden Arbeit soll es sein, über die funktionelle Charakterisierung der bisher unbeschriebenen Interaktion zwischen PPAR γ und dem Myotubularin Related Protein 7 (MTMR7) einen Beitrag zu leisten zum besseren Verständnis der Regulation des Kernrezeptors und einen möglichen neuen Ansatzpunkt zur Beeinflussung zentraler Signalkaskaden im kolorektalen Karzinom zu identifizieren.

1.1 Die Karzinogenese im kolorektalen Karzinom

Die pathogenetischen Mechanismen, die der Entstehung des kolorektalen Karzinoms zugrunde liegen, lassen sich stark vereinfacht in 3 Gruppen unterteilen: Die klassische Adenom-Karzinom-Sequenz, die etwa 80% der kolorektalen Karzinome zugrunde liegt und durch chromosomale Instabilität (CIN)[15-18] charakterisiert ist. 20%[19,20] weisen eine verstärkte Methylierung von Cytosin-phosphatidyl-Guanin(CpG)-Inseln[16] auf, wobei sich diese aufteilt in eine größere Subpopulation [21] mit Tumoren mit fehlerhaftem DNA-Mismatch-Repair-System und resultierender Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und der dritten

Gruppe, die von mikrosatellitenstabilen Tumoren mit verstärkter Methylierung von (CpG)-Inseln gebildet wird.

Dabei ist der entscheidende Schritt zur Initiierung der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz der Verlust des funktionellen Adenomatous-polyposis-coli (APC)-Proteins mit der Folge einer mangelnden Inaktivierung von β -Catenin, hieraus resultierender Überaktivität des WNT-Signalwegs, verstärkter Expression pro-proliferativer Faktoren wie c-Myc und Cyclin D1 und letztlich Förderung von Zellwachstum und Migration. [15,16,22] Änderungen im Aktivitätsniveau des WNT-Signalwegs lassen sich in bis zu 90% der kolorektalen Karzinome nachweisen[23] und die zugrunde liegenden Mechanismen weisen ein breites Spektrum auf. Sie reichen von in verkürzten Proteinen resultierenden Keimbahnmutationen hoher Penetranz in Kombination mit loss of heterozygosity (LOH) insbesondere der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) und der attenuierten familiären adenomatösen Polyposis (aFAP) über Mutationen niedrigerer Penetranz bis hin zu Veränderungen der APC-Promotor-Aktivität und β -Catenin-Mutationen, wie sie sich insbesondere bei Lynch-Syndrom Patienten nachweisen lassen[23,24].

Im Fall der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz ermöglicht dieser initiierende Schritt die Formierung prä-maligner Läsionen, die bereits in frühen Stadien aktivierende KRAS-Mutationen aufweisen und über den Erwerb weiterer genetischer Veränderungen wie dem Verlust von 18q und p53-Mutationen, die zu vermehrter chromosomaler Instabilität führen, die Fähigkeit zu unkontrolliertem, invasivem Wachstum erhalten[15].

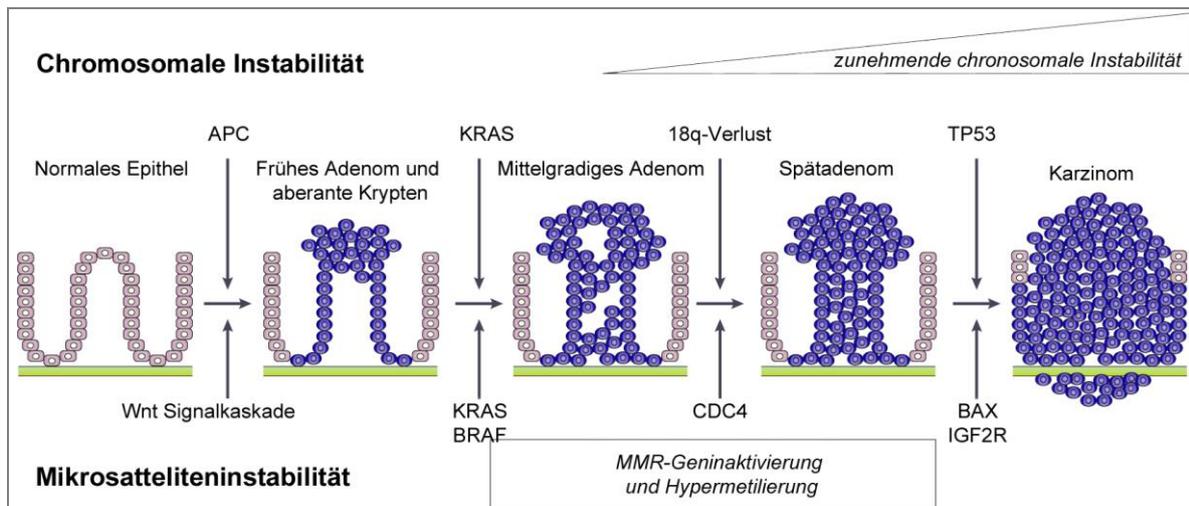


Abbildung 1. Adenom-Karzinom-Sequenz und typische Mutationen im Rahmen der Karzinogenese im mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Karzinom (unten) und in Karzinomen charakterisiert durch chromosomale Instabilität (oben). Während in Tumoren, hervorgegangen aus der klassischen Adenom-Karzinom-Sequenz die chromosomale Instabilität beispielsweise durch den Verlust des langen Armes des Chromosom 18 zum Ausdruck kommt ist es ein gestörtes DNA-Reparatursystem in Verbindung mit KRAS- und BRAF-Mutationen, die die Tumorentstehung in mikrosatelliteninstabilen Karzinomen voran treiben. Nach [16]

Der für die zweite Gruppe charakteristische Pathomechanismus ist die Hypermethylierung von CpG-Inseln. CpG-reiche Regionen befinden sich in etwa der Hälfte aller humanen Gene, insbesondere in Abschnitten, die die Expression des

betreffenden Gens positiv regulieren[25]. Hypermethylierung der entsprechenden Region führt zu verminderter Transkription des entsprechenden Abschnitts und tritt spontan im Rahmen des Alterungsprozesses genauso auf[26] wie in der Initiierung von Neoplasien durch Herabregulation von Tumorsuppressorgenen[27]. Kolorektale Karzinome mit erhöhter Methylierungsrate machen etwa 30-40% der sporadischen proximalen und 3-12% der distalen Karzinome aus[28] und lassen sich in 2 Gruppen unterteilen: Den CpG island methylator Phänotyp 1 (CIMP1) mit hohem Methylierungsniveau[15] und methylierungsbedingter Inaktivierung des hMLH1 Gens (s.u.) und den CIMP2, der durch einen hohen Anteil an KRAS-Mutationen und eine intermediäre p53-Mutationsrate charakterisiert ist.[29]

Die pathogenetische Grundlage der dritten, von KRAS und p53-Mutationen unabhängigen Gruppe kolorektaler Karzinome sind Defekte im DNA-Mismatch-Reparatur System, die zur Akkumulation von Mutationen in Mikrosatelliten – kurze repetitive DNA-Sequenzen – führen. Die daraus resultierenden Veränderungen in kodierenden oder regulatorischen DNA-Abschnitten führen zu typischen Mutationen, beispielsweise im Gen des TGF β -Rezeptors Typ II oder Bax.[16] Weitere Charakteristika dieser Gruppe sind BRAF Mutationen (in 53% der Fälle[29]) und die bereits erwähnte hohe Methylierungsrate und daraus resultierende Herabregulation spezifischer Faktoren wie hMLH1, die wiederum zentrale Faktoren der Homöostase des DNA-Mismatch-Reparatur-Systems darstellen[29].

Überlappungen zwischen den Gruppen insbesondere zwischen MSI+ und CIN+ Tumoren kommen vor, sind jedoch insgesamt selten[30]. Die spezifischen molekulargenetischen Charakteristika der drei Gruppen bedingen dabei trotz der gemeinsamen Endstrecke des invasiven kolorektalen Karzinoms Krankheitsbilder, die sich sowohl, was die Morphologie und Lokalisation als auch was das biologische Verhalten bezüglich Therapieansprechen und Prognose angeht, unterscheiden.

Morphologisch handelt es sich bei den CIN+ CIMP- Neoplasien mit Veränderungen im APC/WNT-Signalweg um typische Adenokarzinome tubulärer, villöser oder tubulovillöser Architektur[16,18,31], während ein hohes Methylierungsniveau und BRAF-V600-Mutationen, wie sie für den CIMP1 typisch sind, insbesondere in serratierten Läsionen zu finden sind¹[18,31-33]. Der CIMP2 nimmt morphologisch eine intermediäre Position ein, ist er doch sowohl in serratierten als auch in adenomatösen Vorläuferläsionen nachweisbar[33]. Gleichzeitig finden sich CIN+ Adenokarzinome genau wie adenomatöse Läsionen des CIMP2 vorzugsweise im linken Kolon, während serratierte Läsionen insbesondere rechtskolisch auftreten[33-35]. Insbesondere die Mikrosatelliteninstabilität konnte als positiver prognostischer Marker etabliert werden[21,36]. Zudem erwies er sich als negativer prädiktiver Marker für ein Therapieansprechen auf eine adjuvante Chemotherapie mit 5-FU[36,37], was dazu führte, dass sich die Europäische Gesellschaft für Medizinische Onkologie (ESMO) dafür ausspricht, den Mikrosatellitenstabilitätsstatus insbesondere im UICC Stadium 2 in die Entscheidung über eine adjuvante Chemotherapie mit einzubeziehen[38].

¹ Serratierte Läsionen werden in einem eigenen Abschnitt näher behandelt

1.2 Ras Mutationen

Die Familienmitglieder der Rat-sarcoma(RAS)-Onkogene HRAS, KRAS und NRAS sind die am häufigsten mutierten Proto-Onkogene in menschlichen Tumoren und finden sich in 30% bis 50% der kolorektalen Karzinome[16,39]. Sie kodieren für vier unterschiedliche, strukturverwandte RAS Proteine: HRAS, NRAS und die Isoformen KRAS4A und KRAS4b[40]. Ras-Proteine spielen eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion von Rezeptor-Tyrosinkinasen wie dem EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)[15] und aktivierende Mutationen der Ras-Gene gelten als negative Prädiktoren für zielgerichtete Therapien gegen eben diesen[9].

Funktionsfähiges RAS-Protein ist ein zytoplasmatisches, membrangebundenes Mitglied der Familie der kleinen G-Proteine, lokalisiert insbesondere an der Plasmamembran, der Membran des Endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparats[16]. Als solches existiert es in einer aktiven GTP(Guanosintriphosphat)-gebundenen Form, die durch Hydrolyse oder Austausch des Triphosphats in eine inaktive GDP(Guanosindiphosphat)-gebundene Form überführt wird. Sowohl der Austausch als auch die Hydrolyse werden über GTPase aktivierende Proteine (GAPs) oder Nukleotidaustauschfaktoren (guanine-nucleotide exchange factor, GEF) gefördert und somit die physiologische RAS-Aktivität gehemmt[16,40]. Aktiviertes RAS-Protein vermittelt in einem onkogenetischen Umfeld anti-apoptotische und mitogene Signale.[40]

Mutationen des KRAS-Onkogens, die sowohl bevorzugt im kolorektalen als auch im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom[40] auftreten, finden sich insbesondere in Exon 2 (Kodon 12 und 13) sowie in Exon 3 (Kodon 61)[15] und verhindern die oben beschriebene Inaktivierung von RAS durch GAPs[41]. Dabei resultieren unterschiedliche Mutationen desselben Kodons in einer unterschiedlich starken Hemmung der GAP-Aktivität[40], haben unterschiedlichen Einfluss auf die Prognose des Patienten und die Therapieeffektivität[42]. Beispielsweise sind KRAS^{G12V}-Mutationen hierbei zumindest in Karzinomen der Lunge mit einer schlechteren Prognose assoziiert als KRAS^{G12D}-Mutationen[43]. Im Fall des kolorektalen Karzinoms steht der Einfluss der RAS-Mutation allein auf die Prognose des Patienten jedoch nach wie vor zur Diskussion. Auch hier scheint ausschließlich die KRAS^{G12V}-Mutation von prognostischer Bedeutung zu sein, allerdings bei widersprüchlicher Ergebnislage großer Studien[15]. An Stelle der Rolle als Prognosemarker ist in den letzten Jahren zunehmend die Bedeutung der unterschiedlichen KRAS-Mutationen als im allgemeinen negativ prädiktiver Marker für zielgerichtete Therapien gegen den EGF-Rezeptor getreten[9,15,42].

1.3 PPAR γ – Einleitung und allgemeine Funktionsweise

Die Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPARs) α , β/δ und γ bilden eine Subgruppe der ligand-aktivierten Transkriptionsfaktoren, die in ihrer Funktion als Regulatoren des Glukose- und Lipidhaushalts, von Inflammation und Proliferation[7] zentrale Aspekte der Karzinogenese beeinflussen.

Die Aktivierung der PPARs erfolgt stets über endogene Liganden, die als Derivate des Fettsäuremetabolismus den Ernährungs- und Entzündungsstatus des Organismus widerspiegeln[44] und durch die Beeinflussung der Expression von Genen des Lipid- und

Glukosemetabolismus das zelluläre Gleichgewicht in Zusammenhang mit Nahrungsaufnahme und Fastenperioden aufrechterhalten[7]. Die drei PPARs weisen erhebliche Unterschiede auf, sowohl die Gewebeverteilung als auch das Ligandenspektrum betreffend[8]. Gemeinsam ist ihnen jedoch der Aktivierungsmechanismus, der zur Expression der entsprechenden Zielgene führt: Die Rezeptor-Ligand-Interaktion führt zu einer Konformationsänderung, die die Freisetzung von Histon-Deacetylase-(HDAC)Co-Repressoren zur Folge hat, was eine Interaktion zwischen dem jeweiligen PPAR und dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ermöglicht. Dieses Heterodimer bildet einen Komplex mit der RNA-Polymerase II und Koaktivatoren mit Histon-Acetyl-Transferase-(HAT)-Aktivität, die nach Bindung an entsprechenden DNA-Bindeelemente durch Chromatinumformung letztendlich die Genexpression ermöglichen[7].

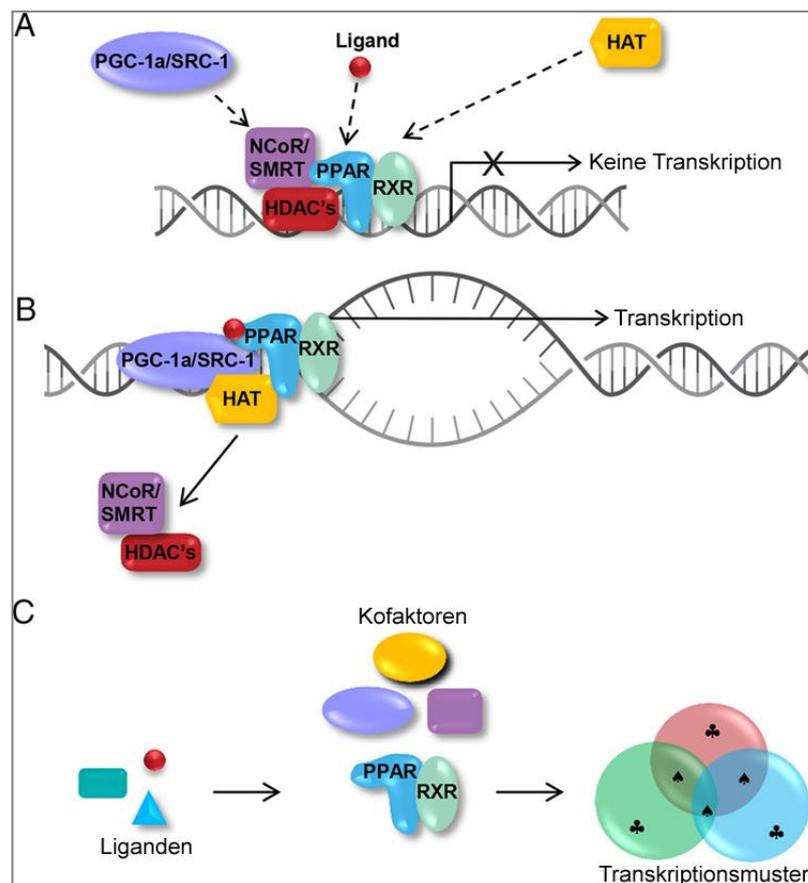


Abbildung 2. **Der Mechanismus der PPAR γ -Aktivierung:** **A:** Die Rezeptor-Ligand- Interaktion führt über die Freisetzung der HDACs, was die Interaktion zwischen PPAR und RXR ermöglicht. **B:** In Folge der Komplexbildung kommt es durch Rekrutierung von Koaktivatoren mit HAT-Aktivität und der RNA-Polymerase 2 zur Chromatinumformung und Transkriptionseinleitung. **C:** Die Bindung unterschiedlicher Liganden führt dabei zu spezifischen Genexpressionsprofilen (s. Abschnitt 1.3.2) nach [45]

1.3.1 Physiologie

So ähnlich der Aktivierungsmechanismus, so sehr unterscheiden sich die drei PPARs sowohl bezüglich ihrer Liganden als auch ihrer Gewebsverteilung. Dabei findet sich PPAR α insbesondere in metabolisch-aktiven (Leber, Skelettmuskel, Braunes Fettgewebe) und kardiovaskulären (Herz, Niere, Gefäßendothel, glatte Gefäß-Muskulatur, Monozyten) Geweben[46] und reguliert durch die Förderung der Fähigkeit von Zellen, Fettsäuren zu mobilisieren und zu verbrennen, die Lipid-Homöostase[7] des Organismus. Entsprechend der Funktion ligandenaktivierter Kernrezeptoren dienen PPAR α endogene Fettsäuren und Fettsäurederivate als natürliche Liganden[46], die so eine Art "Fettsensorfunktion" des Rezeptors ermöglichen. Des Weiteren ist der Kernrezeptor das Zielprotein für Fibrate[45], die als synthetische Liganden in der Therapie von Hyperlipidämien eingesetzt werden. Genau wie PPAR α ist PPAR β/δ an der Regulation der Glukose- und Lipidhomöostase beteiligt und wie PPAR α wird er durch Produkte des Fettmetabolismus aktiviert. Der Rezeptor wurde in den meisten menschlichen Geweben nachgewiesen[47], das höchste Expressionsniveau konnte jedoch - zumindest bezüglich murinen Gewebes - in der Haut und im Gastrointestinaltrakt nachgewiesen werden[48]. Eine PPAR β/δ -Aktivierung führt zu einer Erhöhung des Serum-HDL-Spiegels[49], verbesserter Insulinsensitivität und zeigte erhebliche antiinflammatorische Effekte in hepatischem Gewebe[7].

Insgesamt lässt sich also feststellen, dass beide PPARs eine nicht unerhebliche protektive Effektivität in Bezug zu der Verminderung kardiovaskulärer Risikofaktoren aufweisen.

Was PPAR γ angeht, so entstehen nach Transkription des Gens auf Chromosom ch3p25 und alternativem Transkriptionsstart zwei Rezeptorisoformen: PPAR γ 1 und PPAR γ 2. PPAR γ 1 konnte in zahlreichen Geweben (darunter beinahe alle des Gastrointestinaltrakts) nachgewiesen werden[46] mit weißem und braunem Fettgewebe als Hauptexpressionsort[50], während die 30 Aminosäuren längere Isoform PPAR γ 2 ausschließlich in Fettgewebe exprimiert wird[8]. Die Struktur des humanen PPAR γ -Proteins gleicht im Großen und Ganzen der der anderen Mitglieder der Kernrezeptor-Superfamilie: Er besteht aus vier Domänen (A/B, C, D und E/F) mit spezifischen strukturellen und funktionellen Charakteristika (s. Abbildung 2).

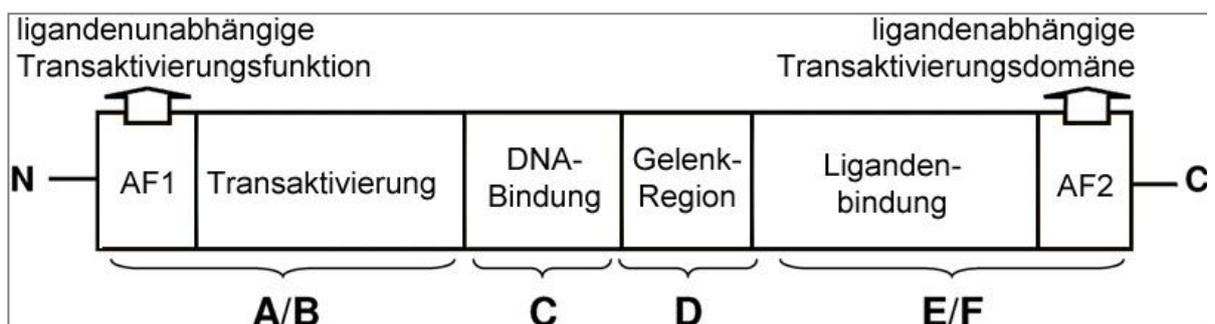


Abbildung 3. Die Proteinstruktur des Kernrezeptors PPAR γ . Die N-terminale A/B – Domäne bildet eine ligandenunabhängige Transaktivierungsdomäne und beinhaltet mit Domäne AF1 den Hauptangriffspunkt für die Phosphorylierung des Kernrezeptors[8]. Die Domäne C vermittelt die selektive DNA-Bindung an Peroxisome Proliferator responsive elements (PPRE) mit Hilfe zweier gefalteter Zinkfinger-Motive. Die D-Region fungiert über die Bindung von Korepressoren und Koaktivatoren als regulatorische Untereinheit. Region E/F enthält die Ligandenbindedomäne sowie die C-terminale ligandenabhängige Transaktivierungsdomäne AF2 und ist verantwortlich für die Interaktion mit dem Kernrezeptor RXR. Nach [8]

Mit Blick auf Metabolismus und Glukosehomöostase führt die Aktivierung des Kernrezeptors durch Förderung der Adipozytendifferenzierung und der hierdurch gesteigerten Expression von GLUT4 und lipogener Gene wie AP2 und CD36[51,52] zu vermehrtem Glucoseeinstrom und Triglyceridsynthese im weißen Fettgewebe. Verstärkt wird diese insulinsensitivierende Wirkung durch die Suppression der Sekretion proinflammatorischer Mediatoren in Folge einer PPAR γ -vermittelten Verschiebung des Gleichgewichts von proinflammatorischen M1 zu antientzündlichen M2 Makrophagen im Fettgewebe [53-55]. Zudem ist es die gesteigerte Mobilisation von Triglyceriden aus Muskeln und Leber, die gepaart mit einer erheblich erhöhten Triglyceridaufnahme durch das Fettgewebe zu einer Senkung der Plasmatriglyceride führen[50,52,56].

Die Reduktion der Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und Interleukin 6 durch Hemmung der Aktivität des Transkriptionsfaktors NF κ B leistet nicht nur einen Beitrag zur metabolischen Funktion des Rezeptors, sondern trägt gleichsam zur protektiven Wirkung des Rezeptors, was Tumorentstehung und Progression angeht, bei[7,57].

Des Weiteren führt die Aktivierung des Kernrezeptors zu einer direkten Beeinflussung des Zellzyklus etwa durch die Reduktion der Expression von Cyclin D1[58], der Förderung der Transkription der Inhibitoren der cyclin-abhängigen Kinase p21 und p27[59] und einem vermehrten Abbau von β -Catenin[60]. Neben antiinflammatorischen und die Differenzierung fördernden Effekten ist die Induktion der Gene pro-apoptotischer Faktoren wie BAX und BAD[61] und die Hemmung von Apoptoseinhibitoren wie Bcl-2[62] eine weitere Säule der tumorprotektiven PPAR γ -Funktion. Diese Mechanismen gemeinsam mit der Beobachtung einer vermehrten Expression von mRNA von Markern der terminalen Differenzierung wie E-cadherin und der alkalischen Phosphatase[7] werden ergänzt durch in vivo Modelle, in denen sich die tumorprotektive Wirkung des Rezeptors bestätigte. So führt der intestinale Verlust von PPAR γ beispielsweise in Mäusen des ApcMin/+-Modells im Dün- und insbesondere im Dickdarm zu einer vermehrten Adenom und Karzinom-Inzidenz[63], ein Effekt, der sich über die Verminderung der PPAR γ -abhängigen Caveolin-Expression erklären lässt[64]. Im Falle des kolorektalen Karzinoms bieten diese in vivo und in vitro gewonnenen Erkenntnisse eine Erklärung für den günstigen prognostischen Effekt der Expression des Kernrezeptors[65]. Ähnliche Beobachtungen lassen sich nicht nur für das kolorektale Karzinom, sondern auch für andere Karzinomen der Lunge, Prostata und Mamma machen[66].

1.3.2 Liganden

Die Bandbreite der Substanzen, die zu einer Aktivierung der Transkriptionsaktivität des Kernrezeptors PPAR γ führen, ist groß und reicht von Bestandteilen oxidiertes Low Density Lipoproteinen (LDL) wie 15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2 und einfach- und mehrfach ungesättigter Fettsäurederivate[44,67,68] über Metabolite des Arachidonsäurestoffwechsels [69] bis hin zu Serotonin-Metaboliten[70] und endogenen wie exogenen Cannabinoiden[71-73]. Eine Rezeptoraktivierung in physiologisch vorkommenden Konzentrationen konnte jedoch mit Ausnahme der 5-Hydroxytryptamin-Metabolite für keine der aufgeführten Substanzen gezeigt werden[44,74]. Im Gegensatz hierzu erwies sich die PPAR γ -Affinität von Nitroalkenderivaten der Linolensäure als vergleichbar mit der hohen synthetischer PPAR γ -Liganden und diese konnten in aktivierenden Konzentrationen in Erythrozyten und im Blut-Plasma nachgewiesen werden[44]. In Anbetracht der Kernlosigkeit von Erythrozyten erscheint die Rolle des Kernrezeptors PPAR γ in diesem Kompartiment unklar, die PPAR γ -Liganden-vermittelte Apoptoseinduktion sowohl in Erythrozyten als auch in B-Lymphozyten [75,76] legt

jedoch einen Einfluss auf die zelluläre Homöostase myeloischer und lymphatischer Zellen über nicht genomische Effekte nahe. Die Suche nach einem endogenen PPAR γ -Liganden kann also keinesfalls als abgeschlossen bezeichnet werden. Zwar ließen sich mit der Xanthin-Oxidoreduktase (XOR) und dem PPAR γ -induzierten Enzym Retinol-Saturase mögliche Produzenten endogener Liganden identifizieren[44], allerdings war bei diesen entweder das PPAR γ -bindende Produkt unbekannt (XOR)[77] oder die erwarteten Effekte sind in vivo nicht reproduzierbar (Retinol-Saturase)[78].

Mit dem Nachweis des serotonergen PPAR γ -Proteins scheint jedoch zumindest für den Gastrointestinaltrakt, dem Ort, an dem die höchste Serotoninkonzentration im menschlichen Körper nachweisbar ist, ein Mechanismus der physiologischen PPAR γ -Aktivierung beschrieben zu sein, der gleichzeitig die Bedeutung des Kernrezeptors in dieser Körperregion, die sich in diversen Modellen experimentell herbeigeführter Kolitis andeutet[79,80], unterstreicht.

Neben agonistisch wirkenden endogenen Liganden lässt sich mit dem Phospholipid „cyclic phosphatidic acid“ (CPA) mindestens ein potenter, endogen durch die Phospholipase D2 produzierter Ligand nachweisen, der bereits in physiologischen Konzentrationen die PPAR γ -Aktivität antagonisiert[44,81].

Verantwortlich für die strukturelle Variabilität möglicher endogener wie exogener Liganden ist die Größe der Ligandenbindedomäne [56], die nicht nur die Funktion des Kernrezeptor als Sensor des metabolischen Status des Organismus ermöglicht[56], sondern über Bindung unterschiedlicher Liganden an variierende Stellen der Bindetasche und die somit variierenden Konformationsänderungen nach Bindung verschiedener Liganden auch die Interaktion mit diversen Koaktivatoren und Repressoren und somit variierende Genexpressionsprofile zur Folge hat[45,82,83]. So führt die Bindung von Substanzen der Gruppe der Thiazolidinedione zu einer Stabilisierung der Helix H12, was die Bindung von Coaktivatoren ermöglicht und lange Zeit als Notwendigkeit für eine suffiziente Rezeptoraktivierung angesehen wurde. Die Bindung von Partialagonisten führt jedoch über die Stabilisierung der Helix H3 und der β -Faltblattregion der Ligandenbindedomäne zu einer Aktivierung der transkriptionellen Aktivität während Helix 12 destabilisiert wird[84]. Die Vielfalt an Aktivierungsmechanismen erklärt die weite strukturelle Bandbreite synthetischer Liganden, die von kleinen Molekülen wie dem Mesalazin-Verwandten Mesalamin[85] über den primär als Angiotensin 2 Rezeptorantagonisten zugelassenen Stoff Telmisartan[86] bis hin zur prominentesten Gruppe der PPAR γ -Agonisten, den Glitazonen, reicht. Mit Rosiglitazone und Pioglitazone erreichten in den frühen 2000er Jahren zwei Wirkstoffe die Marktzulassung, in die aufgrund ihrer Wirkung als Insulin-Sensitizer große Hoffnungen im Rahmen der Behandlung von Hypertriglyceridämie und Typ 2 Diabetes mellitus gesetzt wurden. Dabei ist es das Fettgewebe als Hauptwirkungsort, das die Glitazone insbesondere in Kombination mit der metformin-vermittelten Reduktion der hepatischen Glukoneogenese zu vielversprechenden Medikamenten machte. Durch ihre Funktion als antidiabetische, antiinflammatorische, Triglycerid senkende und High-Density-Lipoprotein-Spiegel[50,52] steigernde Wirkstoffe scheinen Glitazone ideale Medikamente zur Behandlung der Komplikationen des metabolischen Syndroms zu sein. Die im Rahmen der breiteren medizinischen Anwendung aufgetretenen Nebenwirkungen führten jedoch zu einer starken Einschränkung beziehungsweise dem Entzug der Marktzulassung durch die verantwortlichen Aufsichtsbehörden: Im Fall von Troglitazone war es eine erhebliche Hepatotoxizität, verursacht am ehesten durch eine Störung der mitochondrialen Funktion[87], die zum Entzug der Marktzulassung führte, ein Effekt der sich für Pioglitazone und Rosiglitazone nicht

nachweisen ließ. Im Fall von Rosiglitazone ist es die erhöhte Rate kardialer Ischämien [88], die Zweifel über die Sicherheit des Medikaments aufkommen ließen. Ursächlich hierfür wird unter anderem eine ungünstigere Verschiebung des Serumlipidprofils mit Erhöhung des Gesamtcholesterins und der LDL-Fraktion angesehen[50], ein Effekt, der im Fall von Pioglitazone nicht auftritt. Allen Wirkstoffen der Gruppe gemein ist eine vermehrte Wasserretention, ein Mechanismus auf Ebene der renalen Sammelrohre[89] scheint ursächlich zu sein, lässt sich diese Nebenwirkung doch nach renalem PPAR γ -Verlust im Mausmodell nicht nachweisen[52,56,68]. Dieser Effekt scheint verantwortlich für die erhöhte Rate an Patienten mit hydrop dekompensierten Herzinsuffizienz, die unter Pioglitazonetherapie auftritt, jedoch nicht mit einer erhöhten kardialen Mortalität vergesellschaftet ist[90]. Eine weitere klassentypische Nebenwirkung ist eine langfristige Gewichtszunahme, einerseits bedingt durch die PPAR γ -vermittelte Stimulation des weißen Fettgewebes[52], andererseits ausgelöst durch eine gesteigerte Nahrungsaufnahme in Folge einer Aktivierung des Kernrezeptors im zentralen Nervensystem[91,92]. Etwa 75% der Gewichtszunahme scheinen jedoch – zumindest im Fall von Pioglitazone – durch die vermehrte Wassereinlagerung erklärbar zu sein [93]. Des Weiteren verkompliziert eine erhöhte Inzidenz von Frakturen, insbesondere bei postmenopausalen Typ-2-Diabetikerinnen, bedingt durch eine vermehrte Knochenresorption durch verstärkte Osteoklasten- und verminderte Osteoblastenaktivität eine langfristige Therapie[50,52,68,94]. Eine paradoxerweise beobachtete karzinogene Wirkung ist ein weiteres Problemfeld der Therapie mit Liganden des Kernrezeptors PPAR γ . So ließ sich für Troglitazon eine erhöhte Rate hepatozellulärer Karzinome und Liposarkome nachweisen[50]. Auch im Fall von Pioglitazone besteht der Verdacht auf einen karzinogenetischen Effekt. So zeigte sich eine signifikant erhöhte Prävalenz von Urothelkarzinomen der Harnblase insbesondere im Tiermodell, in einer großen longitudinalen Kohortenstudie ließ sich jedoch ein allenfalls leicht erhöhtes Blasenkarzinomrisiko nachweisen[52,56,95].

1.3.3 Regulation & posttranslationale Modifikation

Neben den Charakteristika mehr oder weniger spezifischer PPAR γ -Liganden unterschiedlicher Affinität ist die posttranslationale Regulation des Kernrezeptors von entscheidender Bedeutung sowohl bezüglich der genomischen als auch die nichtgenomischen PPAR γ -Aktivität betreffend.

Dabei lassen sich die Mechanismen, die für die Regulation des Kernrezeptors von Bedeutung sind, in drei Gruppen unterteilen: 1. Die Manipulation der Rezeptoraktivität durch kovalente Modifikationen wie Phosphorylierung[8,52,96,97], Sumoylierung[8,98,99], Nitrierung[100] oder Acetylierung[52,101], 2. Steuerung der PPAR γ Konzentration durch Ubiquitinierung[102,103] oder Stabilisierung durch die Interaktion mit HSP90[104] und 3. Die Veränderung des Aktivitätsprofils durch subzelluläre Kompartimentierung [6,96]. Die Mechanismen aller drei Gruppen sind für die Charakterisierung des PPAR γ /MTMR7-Komplexes von Bedeutung, nämlich die Modifikation durch Phosphorylierung, die Interaktion mit HSP90 sowie insbesondere die Änderung des zellulären Kompartiments, und sollen im Nachfolgenden näher beschrieben werden.

Phosphorylierung

Entsprechend seiner zentralen Rolle den Glucose- und Fettmetabolismus betreffend und seiner antiproliferativen Eigenschaften ist die Aktivierung von Insulin- und wachstumsfaktorgekoppelten Signalkaskaden der der Phosphorylierung des Kernrezeptors zugrunde liegende Schritt[8]. Die Phosphorylierung des Kernrezeptors führt dabei entweder zur Förderung oder Hemmung der Rezeptoraktivität, je nach Ort und ausführender Kinase: Phosphorylierung des Serinrests Ser112 der AF1-Domäne durch Cyclin-dependent kinase (Cdk)7 und 9[105] führt dabei zu verstärkter PPAR γ -Aktivität, während die Phosphorylierung durch Mitogen-activated Proteinkinase (MAPK), die AMP-aktivierte Proteinkinase und die Proteinkinase C [8,106] zur Reduktion der Ligandenbindungsstärke[107] führt, was eine Interaktion zwischen der AF1-Domäne und der Ligandenbindedomäne nahelegt[8,106]. Insbesondere die PPAR γ -inhibitorische Funktion der MAP-Kinasen „Extracellular-signal-regulated“-Kinasen (ERK)1 und ERK2 ist auf Grund ihrer Rolle als Effektoren der Ras-Kaskade in Zusammenhang mit der Pathogenese des kolorektalen Karzinoms relevant. Darüber hinaus kristallisierte sich in jüngster Zeit die Bedeutung der Cdk5 als PPAR γ -Regulator heraus: Aktiviert nicht durch Cycline, sondern durch p35 und p25 – Zielenzyme zahlreicher Zytokine – inhibiert die Cdk5 die PPAR γ -Aktivität durch Phosphorylierung der Ligandenbindedomäne und stellt so eine Verbindung dar zwischen den mit dem metabolischen Syndrom assoziierten proinflammatorischen Signalwegen und der Regulation der Insulinsensitivität[45,108]. Zusätzlich stimuliert Cdk5 die Phospholipase D2 und somit die Produktion des PPAR γ inhibitorischen Liganden CPA[109]. Dabei besteht in der Beteiligung am Vesikelverkehr insbesondere im Zentralnervensystem die Möglichkeit eines Anknüpfungspunktes zwischen Myotubularinen und der PPAR γ -Regulation durch Cdk5.

Die HSP90/PPAR γ -Interaktion

Bezüglich der Interaktion des Kernrezeptors mit Adapterproteinen soll hier insbesondere auf die Interaktion des Hitzeschockproteins HSP90 mit dem Kernrezeptor eingegangen werden, weil diese, wie unten beschrieben, einen weiteren Ansatzpunkt für die Beschreibung des Zusammenspiels des Kernrezeptors PPAR γ mit der Phosphatase MTMR7 darstellt. Hier ist es insbesondere die Arbeit von Wheeler et al., die eine erste, genauere Beschreibung der Interaktion bietet. In der genannten Arbeit wird einerseits ein reziproker Zusammenhang zwischen HSP90-Hemmung und der genomischen Aktivität des Kernrezeptors in vitro gezeigt, gleichzeitig führte eine Überexpression von HSP90 zu einem Anstieg des PPAR γ -Proteinniveaus und einer verstärkten Aktivität des Kernrezeptors. Als Zelllinie verwendeten Wheeler et al. dabei HEK293 Zellen, eng verwandt mit der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie HEK293 T. Zudem konnte gezeigt werden, dass PPAR γ und HSP90 in vivo einen Proteinkomplex bilden[104].

Die MAPK-vermittelte Änderung der subzellulären Lokalisation

Die Änderung des zellulären Kompartiments stellt eine schnelle und häufige Möglichkeit zur Aktivierung oder Inhibition intrazellulärer Signalkaskaden dar. Im Fall des Kernrezeptors PPAR γ ist eine Lokalisationsänderung von nukleär nach zytosolisch, einhergehend mit einer erniedrigten genomischen Aktivität des Rezeptors, ein häufiges Ereignis in soliden Tumoren des Magens ([110]), im Plattenepithelkarzinom der Lunge [111] und der Mamma [112]. Es konnte von Burgermeister et al. gezeigt werden, dass es die Interaktion mit dem Protein MEK1 ist, die nach Phosphorylierung der Kinase in Folge der Aktivierung Ras-abhängiger

Signalkaskaden zu einem Export des Kernrezeptors aus dem Nukleus in das Zytosol führt [113]. Dabei ist es eben diese Lokalisationsänderung, die eine Interaktion des Kernrezeptors mit zytoplasmatischen Proteinen wie MTMR7 ermöglicht und mitverantwortlich gemacht wird für Effekte der Therapie mit PPAR γ -Agonisten, die nicht durch die genomische Aktivität des Rezeptors zu erklären sind [96].

1.4 Myotubularin Related Protein 7

Wie eingangs erwähnt, sind aktivierende Mutationen von Proteinen wachstumsfaktor-assoziiierter Signalkaskaden, abgesehen von ihrer Rolle als prognostische Marker für ein schlechteres Überleben, ein Hauptgrund für das Nicht-Ansprechen zielgerichteter Therapien gegen den EGF-Rezeptor. Hierzu zählen neben den oben genannten Mutationen der Ras-Gene auch aktivierende Mutationen der PI3-Kinase, die als Veränderungen des PIK3CA-Gens in 10 – 20% der kolorektalen Karzinome auftreten [114]. Die Rolle PPAR γ -Proteins als Induktor Ras-inhibitorischer Proteine, der in der Lage ist den Ras-vermittelten Phänotyp von Neoplasien des Gastrointestinaltrakts abzumildern, wurde oben dargestellt, ebenso der für die Reduktion der genomischen Aktivität des Kernrezeptors durch die aktivierte Ras-Kaskade verantwortliche Mechanismus. Das resultierende Übergewicht der zytosolischen im Vergleich zur nukleären PPAR γ -Fraktion stellt aus zwei Gründen die Grundlage für weitere Untersuchungen im Rahmen der onkologischen Forschung dar. Zum einen ist mit der Lokalisationsänderung des Kernrezeptors von nukleär nach zytosolisch ein Mechanismus der Ras-Hemmung ausgeschaltet. Zum anderen stellt diese zytosolische Fraktion als von der genomischen Aktivität des Kernrezeptors unabhängiger Ligandenpool eine mögliche Ursache für die mit Glitazonen assoziierten Nebenwirkungen dar.

Diese Überlegungen führten zur gezielten Suche nach zytosolischen Bindepartnern des PPAR γ -Proteins. Durch massenspektrometrische Analyse zytosolischer PPAR γ -Immunpräzipitate durch Elke Burgermeister und Teresa Friedrich [115] gelang neben der Identifikation des Docking Proteins (DOK) 1 der Nachweis einer Komplexbildung zwischen dem Kernrezeptor und dem Myotubularin Related Protein (MTMR)7.

Der nachfolgend soll nun die bisher unbekannte Rolle des MTMR7 Proteins im kolorektalen Karzinom und die Bedeutung der Interaktion mit dem Kernrezeptor PPAR γ näher beleuchtet werden.

1.4.1 Der PI3K-Signalweg

Bevor eine eingehendere Diskussion der Myotubularine und des Myotubularin-Related-Protein 7, dem zentralen Thema dieser Arbeit, stattfinden kann, ist eine kurze Betrachtung der Phosphatidylinositole vonnöten, der Gruppe sekundärer Botenstoffe, die den Substratpool der Myotubularine darstellt und die ihre Aktivität mit zahlreichen zellulären Funktionsfeldern verknüpft.

Phosphatidylinositole bestehen wie alle Phosphoglyceride aus einem Glyceringrundkörper verestert mit zwei apolaren, durch Fettsäuren gebildeten Resten und einer polaren Kopfgruppe, in diesem Fall gebildet durch einen über einen Phosphosäurediester gebundenen Inositolrest, wobei die Membranintegration insbesondere in die Innenschicht der Zellmembran durch die beiden apolaren Fettsäurereste vermittelt wird [116], während die polare Kopfgruppe Interaktionen mit zytoplasmatischen Proteinen ermöglicht. Durch

Phosphorylierung der OH-Gruppen dieses Inositolrests entstehen die unterschiedlichen Derivate des Phosphoinositostoffwechsels, dargestellt in Abbildung 3.

Neben ihrer Bedeutung für ein funktionelles Endozytosenetzwerk ist es ihre Funktion im Rahmen der Zytoskelettorganisation und Polarität[117] und vor allem ihre Rolle als sekundärer Botenstoff Wachstum-stimulierender Signalkaskaden, die Synthese und Abbau der Phosphatidylinositole seit langem zum Gegenstand onkologischer Forschung machen.

Einen Überblick über die Funktion der einzelnen Phosphoinositderivate und ihre Synthese gibt wiederum Abbildung 3.

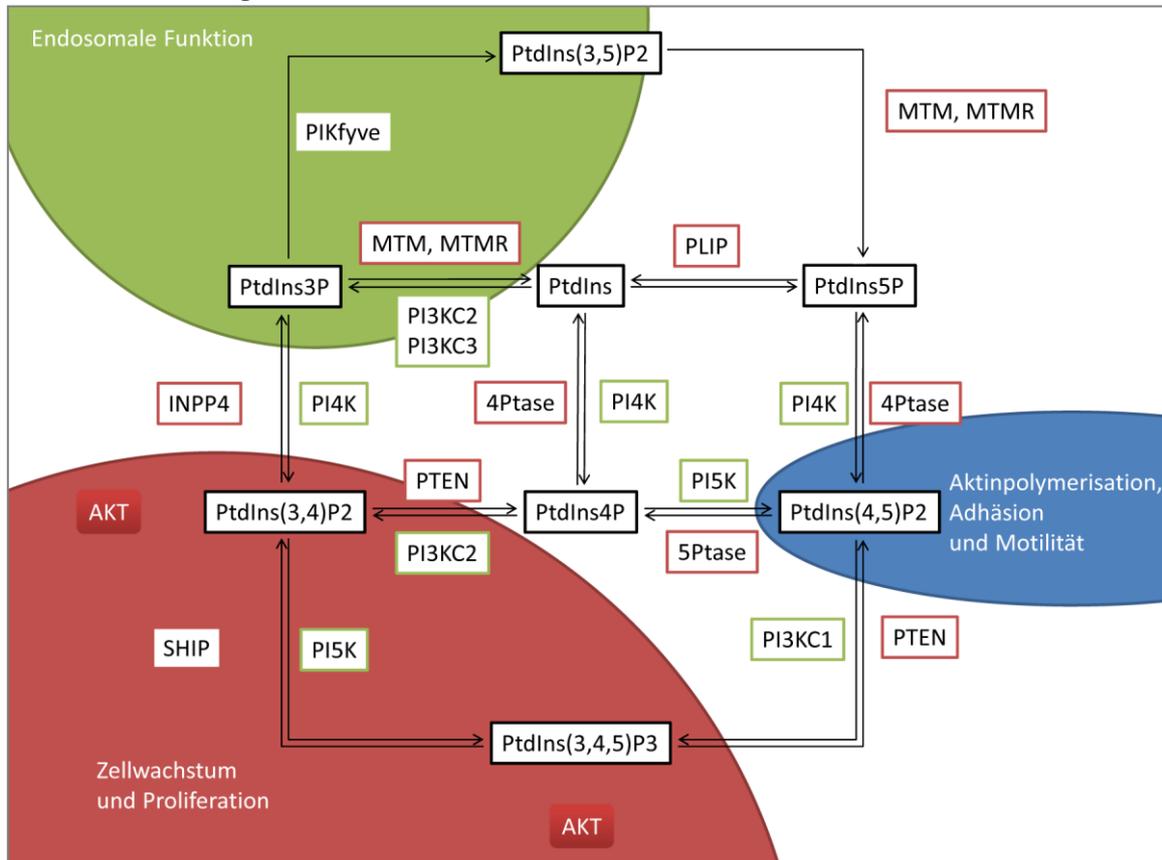


Abbildung 4. **Der Phosphatidylinositol-Metabolismus** Dargestellt sind die Produkte und Edukte des Phosphatidylinositol-Metabolismus (schwarze Kästen) sowie die die Hin-oder Rückreaktion (Pfeile) katalysierenden Enzyme, wobei es sich bei den rot markierten um Phosphatasen und bei den grün umrandeten um Kinasen handelt. Die farbige unterlegte Fläche gibt Auskunft über die zellphysiologische Funktion. Aus der Grafik lässt sich einerseits ablesen, dass eine Änderung der Konzentration eines Phosphatidylinositolphosphats zwangsläufig eine Verschiebung des Produkt-Edukt-Gleichgewichtes nach sich zieht, sodass sich der gesamte PIP-Metabolismus in die eine oder andere Richtung verschieben kann. Diese Aussage muss dadurch relativiert werden, dass die katalysierenden Enzyme und Substrate relativ fest bestimmten Membrankompartimenten zugeordnet sind. So finden sich die meisten Myotubularine vesikelassoziiert, während die PI3-Kinasen insbesondere an der zytoplasmatischen Zellmembran lokalisiert sind. Besondere Bedeutung kommt in dieser Grafik den beiden AKT-aktivierenden Phosphatidylinositolen PtdIns(3,4,5)P3 und PtdIns(3,4)P2 zu. Im hier diskutierten Zusammenhang lässt sich eine Reduktion des Produktpools von INPP4 und PTEN postulieren, was zu einer gesteigerten Aktivität der beiden Enzyme und der Phosphatase SHIP und damit zu einer Reduktion des PtdIns(3,4,5)P3- und PtdIns(3,4)P2-Pools führen könnte. (nach Hnai et al., Balla et al. & Bunney et al.)

Im Nachfolgenden soll insbesondere das durch Klasse 1 PI3-Kinasen vermittelte Signaling näher beleuchtet werden, da es einerseits im Rahmen des kolorektalen Karzinoms von Bedeutung ist [117-119] und andererseits, wie weiter unten beschrieben, in nicht unerheblichem Maße durch MTMR7 beeinflusst wird.

Es existieren drei Klassen von PI3Ks, deren Hauptfunktion in der Phosphorylierung von Phosphatidylinositol an Position 3 des Inositrings liegt. Dabei sind es insbesondere die Isoformen der Klasse 1, die das für die Signaltransduktion wachstumsfaktoraktivierter Signalkaskaden notwendige $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ und $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ synthetisieren, während Mitglieder der Klasse 2 $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ und zu einem geringen Teil $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ bilden und Klasse 3 PI3Ks ausschließlich die Synthese von $\text{PtdIns}(3)\text{P}$ katalysieren[120]. Die Mitglieder aller drei Klassen bestehen aus einer katalytischen und einer regulatorischen Untereinheit, die insbesondere als Adapterprotein fungiert. Im Fall der insbesondere für die Betrachtung der Zelllinie HCT116 relevanten PI3K der Klasse 1 Gruppe A handelt es sich bei der regulatorischen Untereinheit um das Protein p85[121], das die katalytischen Untereinheiten p110 α , p110 β und p110 δ , Produkte der Gene PI3KCA, PI3KCB und PI3KCD bindet. Das initiale Moment für die drei Mechanismen, die zur Aktivierung der PI3K führen, ist die Ligandenbindung, Dimerisierung und Autophosphorylierung von Rezeptor-Tyrosin-Kinasen[122]. Der erste Aktivierungsmechanismus resultiert aus der Bindung von p85 an phosphorylierte Reste der RTK, der zweite ist die Folge der Bindung der Adapterproteine GRB2 an den RTK, gefolgt von der Rekrutierung des Proteins GAB an GRB2, was wiederum die Bindung von p85 nach sich zieht. Der dritte Mechanismus stellt das entscheidende Bindeglied zwischen PI3K und den Ras-vermittelten Signalkaskaden dar: Nach Bindung und Aktivierung des Proteins SOS erfolgt die Aktivierung von Ras, was zu einer p85-unabhängigen Aktivierung der katalytischen Untereinheit von p85 führt und ein zentrales Ereignis der Ras-vermittelten Tumorigenese zumindest in Tumoren der Haut und Lunge darstellt[121]. Entsprechend führt dieser dritte Mechanismus nicht nur zur Aktivierung der p85-abhängigen Untereinheiten α , β und δ , sondern aktiviert gleichsam die katalytische Untereinheit p110 γ [123]. Aktivierende Mutationen des Gens PI3KCA der katalytischen Untereinheit p110 α finden sich in einem signifikanten Anteil kolorektaler Karzinome[124], wobei es sich insbesondere um zwei Punktmutationen der helikalen Domäne und die Mutation H1047R in der Kinase-Domäne handelt. Letztere, die auch in der Zelllinie HCT116 vorliegt[125], führt zu einer zusätzlichen, Ras-Aktivierung unabhängigen Stimulation durch p85[121]. Die Aktivierung der PI3K bedingt die Synthese der sekundären Botenstoffe $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$ und $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$. Diese Ereignis ermöglicht die Membranbindung und Assoziation von PH-Domäne-haltigen Proteinen wie der Phosphoinositide-dependent Kinase 1 (PDK1) und AKT, was wiederum zur Phosphorylierung des Threonin 308-Rests von AKT durch PDK1[126] und somit zum ersten Schritt der AKT-Aktivierung führt. Die vollständige Aktivierung von AKT erfolgt durch die Phosphorylierung des Serin 473-Rests durch den mTORC2, im Sinne einer positiven Rückkopplung[127]. AKT-Aktivierung führt schließlich einerseits über die Hemmung proapoptotischer Effektoren der Bcl-2-Familie[128], negative Regulation von NF- κ B und forkhead-Transkriptionsfaktoren und p53-Antagonisierung [121] zu vermehrtem Zellüberleben und fördert über die Aktivierung der mTOR-Komplexe 1&2 und deren Effektoren wie dem ribosomalen S6 Protein[129] die Proteinsynthese.

Eine weitere, zentrale Funktion von AKT besteht neben den beschriebenen, Zellwachstum fördernden Effekten in der Vermittlung anti-diabetischer Funktionen. Insbesondere die Isoformen AKT2 und AKT3[130] vermitteln dabei nach Insulinstimulation die Senkung des Blutzuckerspiegels durch Translokation des Glukosetransporters GLUT4 in die Zellmembran

und die Hemmung der Glukoneogenese durch negative Regulation der Gene der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase und Glukose-6-Phosphatase[129]. Diese isoformspezifischen Effekte sind in Individuen mit diabetischer Stoffwechsellage gestört, was zur Insulinresistenz bezüglich der metabolischen Effekte von AKT führt, gefolgt von einer reflektorischen Hyperinsulinämie.

1.4.2 Myotubularine

Die Gruppe der Myotubularine beinhaltet 16 strukturell verwandte, evolutionär konservierte Proteine, denen neben enger struktureller Verwandtschaft die Regulation des zellulären Phosphatidylinositol (PtdIns)(3)P- und PtdIns(3,5)P₂-Gehalts durch Förderung oder direkte Dephosphorylierung als verbindendes Element zu eigen ist. Trotz ihrer strukturellen Homologie weisen das erstbeschriebene Myotubularin (MTM1) und die 15 Myotubularin-Related-Proteins (MTMRs), bedingt durch unterschiedliche Gewebsexpression, subzelluläre Lokalisation und Regulation durch Komplexbildung mit diversen Bindepartnern jeweils eigenständige Funktionsprofile auf. Durch die Beeinflussung der als sekundäre Botenstoffe fungierenden Phosphatidylinositole beeinflussen sie zentrale, zelluläre Mechanismen wie Autophagie, Proliferation, Vesikeltransport und die Funktion von Ionenkanälen.

1.4.2.1 Struktur & Substrate

Die zentralen Domänen, strukturell konserviert und charakteristisch für fast alle als Myotubularine klassifizierten Proteine, sind die Protein-Tyrosin-Phosphatase-Domänen dualer Spezifität mit CX₅R-Motiv, die Pleckstrin-Homology-Glucosyltransferase, Rab-like GTPase Activator (PH-GRAM)-Domäne und eine „coiled-coil“-Heterodimerisierungsregion[129,131,132]. Andere Domänen von zentraler Bedeutung für die Funktion und Regulation der Myotubularine bilden die Set-Interaction-Domäne (SID) und die Rac-Induced-Recruitment-Domäne (RID) (s. Abbildung 5).

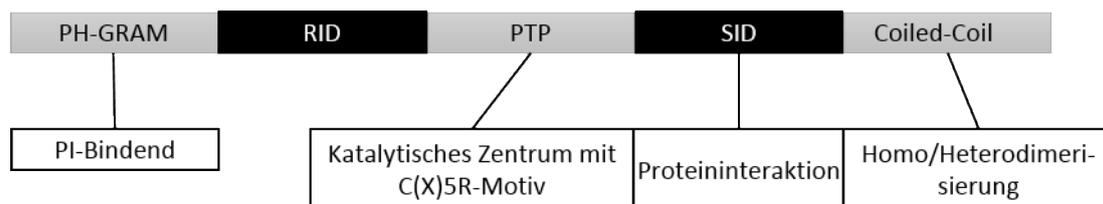


Abbildung 5. **Der schematische Aufbau der Proteine der Myotubularin-Familie.** PH-GRAM: Pleckstrin-Homology-Glucosyltransferase Rab-like GTPase Activator; RID: Rac-Induced-Recruitment-Domäne; PTP: Protein-Tyrosin-Phosphatase-Domäne; SID: Set-Interaction-Domäne; „coiled-coil“-Heterodimerisierungsdomäne.[129,133]

Das eigentliche katalytische Zentrum der Myotubularine wird durch die das CX₅R(Cys-X₅-Arg)-Motiv enthaltende Domäne gebildet, welche gleichzeitig das charakteristische Merkmal von Proteinphosphatasen[132] bildet. Proteinphosphatasen setzen Phosphoester durch Hydrolyse unter Verwendung eines Cystein-Rests als Nukleophil und eines Arginin-Rests als Sauerstoffakzeptor um. Myotubularine nutzen diesen Mechanismus jedoch nicht primär zur Dephosphorylierung von Proteinresten, sondern zur Beeinflussung des zellulären Sekundärer Botenstoff-Pools durch Umsetzung von Phosphatidylinositolen. Diese Selektivität für

Phosphoinositide stellt dabei das entscheidende Alleinstellungsmerkmal der MTMs innerhalb der Gruppe der Proteinphosphatasen dar.

Dabei sind drei strukturelle Charakteristika von besonderer Bedeutung: Zum einen die positive Ladung der Proteinoberfläche, die eine unspezifische elektrostatische Interaktion mit negativ geladenen, PtdIns-enhaltenden Membranen ermöglicht. Zum anderen sind die Maße der Substratbindetasche auf die der PtdIns abgestimmt und drittens wird eine Selektivität gegenüber lipophilen Substraten durch eine hydrophobe, die Substratbindetasche abschirmende Helix ermöglicht.[134] Diese Charakteristika vermitteln die Substratspezifität der Myotubularine bezüglich Phosphoinositiden. Hierbei zeigt sich in vitro die stärkste Affinität bezüglich der Phosphatgruppe an Position Drei des Inositol-Rings insbesondere des Monophosphats PI(3)P und des Bisphosphats PI(3,5)P₂[129,133]. Eine Ausnahme stellen MTMR7 (s.u.) und MTMR14 dar, das zusätzlich eine signifikante Aktivität gegenüber PtdIns(3,4)P₂ und PtdIns(4,5)P₂ aufweist [129].

Mutationen des katalytischen Zentrums, die einen Ersatz der Aminosäure Cystein oder Arginin zur Folge haben, führen dazu, dass nahezu die Hälfte der Myotubularine nicht katalytisch aktiv sind[132,134] (Abbildung 6).

Neben dem bereits beschriebenen katalytischen Zentrum sind weitere Domänen MTM-typisch und von Bedeutung für die Regulation der Proteinfunktion: Die PH-GRAM-Domäne vermittelt über die Bindung von PtdIns(5)P [129], PtdIns(3,5)P₂, PtdIns(4)P und PtdIns(3,4,5)P₃ [135] die Interaktion zwischen Enzym und Substrat. Durch die eingangs erwähnten Domänen RID, SID und Coiled-Coiled wird der zentrale Regulationsmechanismus bezüglich enzymatischer Aktivität und subzellulärer Lokalisation vermittelt: Die Homo- oder Heterodimerisation – insbesondere mit katalytisch inaktiven MTMRs – und die Interaktion mit Proteinen anderer Familien. Insbesondere die „coiled-coil“-Heterodimerisierungsdomäne vermittelt dabei die Interaktion mit anderen Myotubularinen[129,133,136], während die anderen diese entweder verstärken (SID)[136] oder für Proteininteraktionen mit anderen Proteinklassen, wie beispielsweise der Klasse 3 PI3K[137], von Bedeutung sind.

1.4.2.2 Klassifikation & subzelluläre Lokalisation

Auf Grundlage der phylogenetischen Analyse lässt sich die Gruppe der Myotubularine in strukturell verwandte Cluster einteilen, wobei sich drei für aktive und drei für inaktive ermitteln lassen [138]. Mir erscheint jedoch eine Einteilung auf Grundlage der Komplexbildung aktiver und inaktiver Myotubularine sinnvoller, da sie zum einen strukturelle Charakteristika, die die Komplexbildung ermöglichen, subsumiert und dadurch auch die erstgenannte Einteilung aufgreift und zum anderen die funktionellen Unterschiede der einzelnen Myotubularine berücksichtigt. Eine solche Einteilung soll nachfolgend entwickelt werden und ist in Abbildung 6 dargestellt.

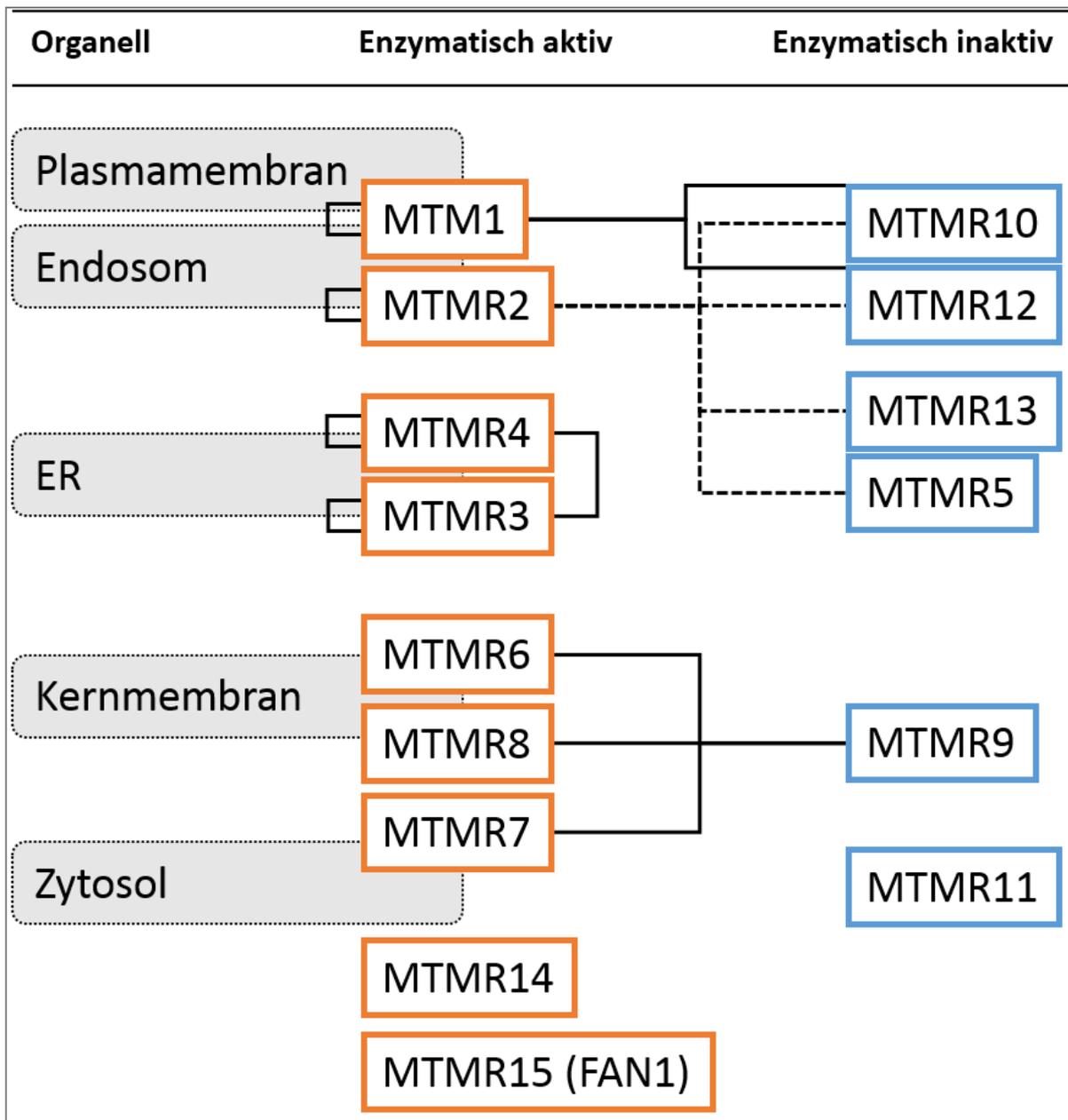


Abbildung 6. Subzelluläre Lokalisation (graue Kästen), aktive (orangene Kästen) und inaktive (blaue Kästen) Mitglieder der Myotubularin-Familie sowie die Komplexbildung der einzelnen Proteine untereinander. Anhand der Komplex-Formation lassen sich MTM1, MTMR2, MTMR 10,12,13 & 5, MTMR3 & 4 sowie MTMR6-9 als Untergruppen zusammenfassen. MTMR14 und 11 lassen sich auf diese Weise – bisher – nicht einordnen. [129,131,133,139]

Auf Grundlage der Komplexbildungen lassen sich aktive und inaktive Myotubularine in vier Gruppen einteilen: Die erste Gruppe umfasst die aktiven Enzyme MTM1 und MTMR2, die Komplexe mit den inaktiven Myotubularinen MTMR10 und 12 und im Fall von MTMR2 zusätzlich mit MTMR13 und MTMR5 [129,131] bilden. Gruppe Zwei nehmen MTMR3 und MTMR4 ein, die beiden aktiven Myotubularine, die jeweils miteinander interagieren, während die dritte Gruppe, gebildet von den enzymatisch aktiven MTMR6, 7 und 8, durch die Komplexbildung mit MTMR9 [131,139] charakterisiert ist.

Die vierte Gruppe wird gebildet durch die Myotubularine 11, 14 und 15, die sich nicht in die drei oben beschriebenen einordnen lassen. Dabei existiert bisher keine Beschreibung der

Funktion von MTMR11, es scheint sich jedoch um ein inaktives Enzym zu handeln[131]. Die Einordnung von MTMR15 in die Gruppe der Myotubularine steht aktuell aufgrund seiner für diese Proteinfamilie einzigartigen Funktion als DNA-Reparaturenzym[140] und der geringen strukturellen Verwandtschaft mit den anderen Myotubularinen[129] aktuell zur Diskussion. Eine Interaktion zwischen MTMR14 und anderen Myotubularinen ist nicht beschrieben und aufgrund der Tatsache, dass MTMR14 weder über eine „coiled-coil“-Heterodimerisierungsdomäne noch über eine der anderen Domänen, die in Zusammenhang mit myotubularintypischen Interaktionsmechanismen beschrieben[129] sind, verfügt, unwahrscheinlich.

In Anbetracht der strukturellen und mechanistischen Ähnlichkeit der unterschiedlichen Myotubularine, die dennoch unterschiedliche, zelluläre Funktionen erfüllen, wird die intrazelluläre Lokalisation als ein Hauptregulationsmechanismus der funktionellen Spezifität der MTMs angesehen[129,134]. Der gegenwärtige Kenntnisstand diesbezüglich ist in Abbildung 6 wiedergegeben. Zu beachten ist dabei, dass bezüglich der exakten, subzellulären Lokalisation insbesondere Detektionsmethoden, die auf dem Nachweis ektopen, beispielsweise GFP-markierten Proteins beruhen, heterogene Ergebnisse liefern. In Anbetracht der Bedeutung der Komplexbildung für die Myotubularinfunktion, die in Überexpressionsexperimenten selten und am wenigsten in physiologischem Verhältnis simuliert wird, sind dies auf Überexpression beruhenden Lokalisierungsnachweise äußerst kritisch zu bewerten. Deshalb wurde die Übersichtsgrafik, wo immer möglich, auf Grundlage des Nachweises des entsprechenden, endogen-produzierten, unveränderten Proteins erstellt.

1.4.2.3 Regulation

Wie bereits erwähnt, stellt die Komplexbildung mit anderen Myotubularinen den Hauptregulationsmechanismus dieser Enzymklasse dar. Dabei zeigen sich zwei grundlegende Prinzipien in der Beeinflussung der Aktivität aktiver MTMs durch inaktive, dargestellt in Abbildung 6: Zum einen führt die Interaktion zu einer erheblichen Verstärkung der katalytischen Aktivität des aktiven Bindepartners (grüne Verbindungslinien). Zum anderen regulieren inaktive Myotubularine die Lokalisation ihrer aktiven Komplexpartner abhängig vom Aktivierungsstatus der Zelle[129].

Eine Komplexbildung findet sich jedoch nicht ausschließlich zwischen enzymatisch aktiven und inaktiven Myotubularinen, sondern erstreckt sich auch auf Enzyme anderer Klassen. Beispielsweise interagieren MTM1 und MTMR2 in einem Multiproteinkomplex mit der PI3KC3, was die Inaktivierung der beiden Myotubularine zur Folge hat[137]. Der Effekt der Komplexbildung zwischen MTMR7 und dem Kernrezeptor PPAR γ ist ein Gegenstand dieser Arbeit.

1.4.2.4 Zelluläre Funktion

Die Charakterisierung der zellulären Funktionen von Myotubularin und der verwandten Proteine ist gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschung. Dabei lassen sich vier Hauptfunktionsfelder ausmachen, in denen eine adäquate MTM-Funktion von Bedeutung ist: Über die Analyse der Lokalisation der MTM-Substrate PtdIns(3)P und PtdIns(3,5)P $_2$ konnte die Beteiligung der Myotubularine an der Regulation des Membranverkehrs im Rahmen von Endo- und Exozytose[129,133], Makropinozytose[141] und Autophagozytose[133,142,143] nachgewiesen werden. Die Analyse der Pathophysiologie neuromuskulärer Erkrankungen erbrachte den Nachweis der Relevanz der Myotubularine für die strukturelle Integrität quergestreifter Muskulatur[129,144] und die Regulation des intrazellulären Kalzium-[145] und

Kaliumhaushalts[146]. Drittens fand sich mit der Beeinflussung des intrazellulären EGFR-Verkehrs eine Schnittstelle zu den PI3K-assoziierten Signalkaskaden[129,137] und viertens zeigte sich in zahlreichen Untersuchungen ein deutlicher Einfluss auf die Aktivität der AKT-mTORC-Kaskade[142,147,148] und damit auf Proliferation und Differenzierung. Es ist insbesondere dieser letzte Aspekt, der aufgrund seiner Bedeutung im Kontext maligner Erkrankungen im weiteren Verlauf näher beleuchtet werden soll.

1.4.2.4.1 Die Beeinflussung EGFR-vermittelter Signalkaskaden durch Myotubularine

Die Bedeutung der Myotubularine liegt, folgt man der aktuellen Literatur, in der Unterstützung Zellwachstum fördernder, zellulärer Mechanismen, insbesondere im Rahmen der neuronalen und muskulären Entwicklung[129,133].

So werden die enzymatisch aktiven Myotubularine MTM1, MTMR1 & 2, MTMR6[139], 7[149], 8[143] und MTMR12 aufgrund der durch sie vermittelten Hemmung der PARP- und Kaspase vermittelten Apoptose funktionell als „survival phosphatases“ zusammengefasst[133].

Bezüglich des EGF-vermittelten PI3K-Signalings wird ebenfalls eine fördernde Rolle unterschiedlicher Mitglieder der Myotubularinfamilie diskutiert. So zeigten Razidlo et al., dass MTM1 mit einer Reduktion des Phospho-AKT-Gehalts einhergeht[147], MTM1 also die AKT-Funktion fördert, genau wie die Überexpression von MTMR2 [150], die zusätzlich zu einer verminderten EGFR-Degradation[129] und vermehrter ERK1/2-Phosphorylierung [151] führt. Für MTM1-defiziente Mäuse zeigte sich zusätzlich eine Einschränkung der mTORC1-Funktion[142]. Dabei konnte gezeigt werden, dass dieser Myotubularinfunktion die Reduktion des PtdIns(3)P- und PtdIns(3,5)P₂-Gehalts zugrunde liegt[147]. Angesichts der Kolo-kalisation der entsprechenden Myotubularine mit diesen Substraten auf frühen und späten Endosomen[129,131,133] wird als Hauptmechanismus der PtdIns(3P)- und PtdIns(3,5)P₂ Depletion eine Änderung des Vesikeltransports und der Proteinsortierung angenommen[129,133]. Die vermehrte ERK1/2-Phosphorylierung wäre dann ein indirekter Effekt beispielsweise des verminderten EGFR-Abbaus. Die Frage, ob nicht auch eine Verschiebung des Substratgehalts der PI3-Kinasen zu einem veränderten Anfall von beispielsweise PtdIns(3,4,5)P₃ führen könnte, wird in der Diskussion weiter besprochen. Weitere Möglichkeiten der Beeinflussung intrazellulärer Signalkaskaden durch Myotubularine sind die direkte Proteindephosphorylierung, gezeigt für MTMR4 und SMAD-Proteine[152,153]. Zusätzlich konnte zumindest in Zusammenhang mit der PI3K Klasse 3 vermittelten Zytoskelettregulation eine direkte negative Regulation des PtdIns(3)P-bildenden Enzyms durch Komplexbildung mit MTMR8 belegt werden[154].

Insgesamt werden Myotubularine jedoch als Förderer des PI3K-Signalings angesehen und dieser positiven Regulation wachstumsfördernder Signalkaskaden wurde bisher insbesondere im Zusammenhang mit neuromuskulären Störungen Bedeutung zugeschrieben. So ist der Funktionsverlust von MTM1 pathophysiologisches Korrelat der X-gekoppelten zentronukleären Myopathie[129] und Mutationen von MTMR2 und seinem Bindepertner MTMR13 sind verantwortlich für die peripheren Neuropathien M. Charcot-Marie-Tooth Typ 4B1[155] & 2[156]. Das einzige MTMR, das bisher in Verbindung mit soliden Tumoren beschrieben wurde, ist MTMR3. Bereits 2004 beschrieben Yoo et al. eine wachstumshemmende Wirkung in der NSCLC Zelllinie H1299, einhergehend mit einem Zellzyklusarrest in G1 und einer Induktion des CDK-Inhibitors p27[157]. In einer aktuellen Arbeit konnten diese Ergebnisse jedoch zumindest für kolorektale Karzinomzelllinien nicht

reproduziert werden. MTMR3-Knockdown führte in diesem Zusammenhang zu vermehrter Apoptose und Zellzyklusarrest[158].

1.4.2.5 MTMR7 – Struktur, Funktion und Regulation

Nachdem in den Kapiteln zuvor ein Überblick über die Struktur und Regulation von Myotubularinen im Allgemeinen und mit Hinblick auf ihre Rolle bezüglich malignom-relevanter Signalkaskaden im Speziellen gegeben wurde, soll nun der gegenwärtige Forschungsstand über MTMR7, dem eigentlichen Gegenstand dieser Arbeit, umrissen werden. Die erste und bisher einzige ausführlichere Beschreibung von MTMR7 wurde 2003 von Mochizuki et al. verfasst[136]. Murines MTMR7-Protein basiert auf einer 1983 bp umfassenden Sequenz kodierend für ein Proteinprodukt von 75,6 kDa und eine 53,9 kDa umfassende Spleissvariante. Das Protein beinhaltet neben einer aktiven katalytischen Untereinheit mit funktionellem CX₅R-Motiv myotubularintypisch eine SID und eine „coiled-coil“-Heterodimerisierungsdomäne (s.o.). Der Effekt des Spleissens besteht im Verlust eben dieser „coiled-coil“-Heterodimerisierungsdomäne, wahrscheinlich mit der Folge einer gestörten Protein-Proteininteraktion.

In der betreffenden Arbeit wurde MTMR7-RNA-Expression in murinem Hirn-, Leber-, Nieren- und Hodengewebe nachgewiesen, mit der höchsten Konzentration im ZNS. MTMR7-Protein wurde ausschließlich im Hirngewebe nachgewiesen. Auf zellulärer Ebene findet sich GFP-markiertes MTMR7 in kernnahen und zytoplasmatischen Granula. Diese Aussage muss jedoch vor dem Hintergrund der unphysiologischen Verteilung der Myotubularine nach Überexpression, was zu einer zytosolischen Anreicherung der Proteine führt[131], betrachtet werden.

Die enzymatische Aktivität von MTMR7 richtet sich, myotubularintypisch, gegen das membrangebundene PtdIns(3)P, jedoch mit einem im Vergleich zu MTM1-MTMR2 niedrigeren Aktivitätsniveau, vergleichbar mit dem von MTMR6[136,159]. MTMR7 ist jedoch das einzige Enzym dieser Familie, das ein wasserlösliches Substrat (Ins(1,3)P₂) erkennt, und zwar mit einer deutlich höheren Affinität verglichen mit der des membrangebundenen Bisphosphats[136], wobei die funktionelle Bedeutung dieses Produkts noch weitgehend unbekannt ist.

Das entscheidende Moment für die Regulation der MTMR7-Aktivität ist die Komplexbildung. Diese findet, genau wie für MTMR6 und 8 beschrieben, zwischen dem enzymatisch aktiven MTMR7 und der inaktiven Form MTMR9 statt und führt zu einer signifikanten Steigerung der enzymatischen Aktivität. Der größte Teil des MTMR7-Proteins liegt in diesem Komplex vor, wobei die entscheidende Struktur für die MTMR7/MTMR9-Interaktion die „coiled-coil“-Heterodimerisierungsdomäne darstellt.[136]

Die funktionelle Bedeutung von MTMR7 ist noch weitgehend unbekannt. Neben epidemiologischen Studien, die Verbindungen zwischen dem MTMR7-Genvarianten und Prionenkrankheiten[160] bzw. dem Infarktvolume in Zusammenhang mit zerebralen Ischämien[161] herstellten, sind es vor allem die Arbeiten von MacKeigan et al. aus dem Jahr 2005[149] und Guo et al.[162] aus dem Jahr 2013, die dieses Thema näher beleuchten.

Dabei beschreibt die frühere Arbeit MTMR7 auf Grundlage eines RNAi-Screenings als „survival phosphatase“, die mit der Caspase-induzierten Apoptose interferiert [149]. Guo et al. gelang in Zusammenhang mit der T-Zelldifferenzierung der Nachweis einer vermehrten AKT-Phosphorylierung nach RNAi-vermittelter Ausschaltung von MTMR7 in vitro und einen PTEN-ähnlichen Effekt auf die T-Helferzelldifferenzierung in vitro und in vivo[162].

Bezüglich des MTMR7-Bindepartners MTMR9 sind zwei Aspekte von Bedeutung: Erstens unterstützt es in erheblichem Maße die Aktivität seiner Bindepartner MTMR6 und MTMR8 und fördert so deren Funktion in Autophagozytose[143,163], Apoptose und die Wnt-Signalkaskade, zentralen Elementen der Biologie kolorektaler Tumore. Dabei zeigte sich eine signifikante Reduktion der Apoptoserate nach Etoposid-Therapie[139] durch MTMR6/MTMR9-Koexpression, eine Förderung der Autophagozytose durch MTMR8 und MTMR6 [143,163] und eine Abhängigkeit des Wnt-Signalings von MTMR6 und MTMR9[164]. MTMR9 scheint in diesen Fällen also eine eher tumorfördernde Rolle einzunehmen. Zweitens fanden mehrere asiatische, epidemiologische Analysen einen Zusammenhang zwischen dem MTMR9-Gen-Polymorphismus rs2293855 und verminderter Glukosetoleranz, vermehrter Insulinsekretion bei verminderter Insulinsensitivität [165], Übergewicht [166] und dem Metabolischen Syndrom[167].

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Angesichts der oben beschriebenen Fakten stellt sich also die Frage nach der Rolle des Proteins MTMR7 im onkologischen Krankheitsgeschehens, das durch seine Interaktion mit PPAR γ an der Schnittstelle steht zwischen Zellwachstum fördernden und metabolischen Effekten von Rezeptortyrosinkinasen, zwischen den tumorspezifischen Mutationen der Ras- und PI3K-abhängigen Signaltransduktion und dem metabolischen Status des betroffenen Patienten.

Ziel der nachfolgenden Abschnitte soll es sein, neue Einblicke zu gewähren in die Beeinflussung der AKT und ERK1/2 abhängigen Signalwege durch MTMR7, die Bedeutung der Interaktion mit PPAR γ zu beschreiben sowie den Einfluss auf Zellwachstum und Medikamentenwirksamkeit von Chemotherapeutika zu untersuchen. Des Weiteren soll die Expression sowohl in murinem Gewebe als auch in Proben humaner kolorektaler Karzinome untersucht werden, auch und gerade unter Berücksichtigung des metabolischen Hintergrunds.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Name	Caco-2	HCT-116	SW480	HEK-293 T
Ursprungsgewebe[125]	Humanes, kolorektales Adenokarzinom	Humanes, kolorektales Adenokarzinom	Humanes, kolorektales Adenokarzinom	Humane embryonale Niere
MSI Status [125]	MSS	MSI	MSS	
KRAS [125]	wt	G13D	G12V	
PI3CA [125]	wt	H1047R	wt	
CIMP [125]	+	+	-	
CIN [125]	+	-	+	
TP53[125]	E204X	wt	R273H; P309S	
Produzent	American Type Culture Collection, Manassas, USA	American Type Culture Collection, +Manassas, USA	American Type Culture Collection, Manassas, USA	American Type Culture Collection, Manassas, USA

Tabelle 1. Charakteristika der verwendeten Zelllinien

2.1.2 Reagenzien

1,4-Dithiothreitol (DTT)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Gene Ruler 50bp DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Gene Ruler 1kb DNA Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Albumin Fraktion V	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ampicillin >99%	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Antigen unmasking solution	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH Hess. Oldendorf, Deutschland
Complete Mini Protease inhibitor cocktail tablets	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
DH5 α Competent Cells	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid 99,5% GC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
ECL Detection Reagents	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont Buckinghamshire, UK
Ethanol 96% (v/v)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Ethanol absolut zur Analyse	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
EcoRI Restriktionsenzym 20u/μl	New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland
Geneticin (G418)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
GoTaq® Green Master Mix	Promega Corporation, Madison, USA
Histoclear	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
JumpStart™ RedTaq Ready Mix™ PCR Reaction Mix	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
LB-Agar (Lennox)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
LB-Medium (Lennox)	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Methanol	Roth GmbH, Karlsruhe, Germany
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Pertex® Eindeckmedium	Medite GmbH, Burgdorf, Deutschland
Protein A/G PLUS-Agarose sc-2003	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
RNase-free DNase Set	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
Salzsäure (1N)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
SDS ultra pure	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
T4 Ligase 5 u/μl	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
TEMED	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TRIS Ultra Qualität	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Tween® 20	Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 2 Reagenzien

2.1.3 Antikörper

Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) #9101	Cell Signaling Technology, Inc., Massachusetts, USA
Phospho-Akt (Ser473) (193H12) #4058	Cell Signaling Technology, Inc., Massachusetts, USA
Phospho-Akt (Thr308) (C31E5E) #207	Cell Signaling Technology, Inc., Massachusetts, USA
Phospho-S6 Ribosomal Protein (Ser235/236) (D57.2.2E) XP Rabbit mAb #6194	Cell Signaling Technology, Inc., Massachusetts, USA
Anti-MTMR7 (ab121222)	Abcam Ag, Cambridge, England, UK

Tabelle 3 Antikörper

2.1.4 Kits

BCA Protein Assay	Thermo Fisher Scientific, Inc., Surrey, UK
DAB Peroxidase Substrat	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
QIAshredder	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
PureYield™ Plasmid MiniPrep System	Promega Corporation, Madison, USA

RNeasy® Mini	QIAGEN GmbH, Hilden, Deutschland
Vectastain® ABC kit peroxidase Rabbit IgG	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Verso™ cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc., Surrey, UK

Tabelle 4 Kits

2.1.5 Gerätschaften

Axiovert 40 CFL Mikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
Axio Imager A.1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland
LAS 1000 CCD-Camera & Intelligent Dark Box	FUJIFILM Europe GmbH, Düsseldorf, Deutschland
Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Tecan Infinite M200 microplate reader	TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz
25 cm ² and 75 cm ² Zellkulturflaschen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
6-, 12-, 24- and 96-Well Zellkulturplatten	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
100 mm Zellkulturschale	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Petrischale	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Countess Zellzähler	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Countess Objektträger	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Zentrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
HERAcell® 240 Inkubator	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland
LightCycler 480	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
Light Cycler 480 Multiwell Plate 96	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Tabelle 5 Gerätschaften

2.1.6 Software

Light Cycler 480 Software 1.5	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland
CellSens Entry 1.5	Olympus GmbH, Hamburg, Deutschland
ImageJ 1.47v	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software, Inc, La Jolla, USA
AxioVision 4.4	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Deutschland

Tabelle 6 Software

2.1.7 Zellkultur

Dulbecco's Modified Eagle Medium (1x) - GlutaMAXTM	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Fetal Bovine Serum	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA 0,25%	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
PBS Phosphate Buffered Saline pH 7,4	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
TurboFectTM <i>in vitro</i> Transfection Reagent	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Germany

Tabelle 7 Zellkultur

2.1.8 Versuchstiere

2.1.8.1 db/db CaMKGam-Modell

14 bis 17 Wochen alte Mäuse des Stamms B6.BKS(D)-Lepr^{db}/J, die neben einer hetero- oder homozygoten Mutation des Leptin-Rezeptors ein Knockout der Calmodulinkinase aufwiesen, wurden von Dr. rer. nat. Sylvia Katz gezüchtet und zur Verfügung gestellt. Die Organe der betreffenden Mäuse wurden direkt nach der Tötung entnommen, der Gastrointestinaltrakt in isotoner Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurden die Präparate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.1.8.2 C57BL/6J

Organe von Mäusen des Stamms C57BL/6J wurden direkt nach der Tötung entnommen, der Gastrointestinaltrakt in isotoner Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurden die Präparate in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20°C gelagert.

2.1.9 Zellkultur

2.1.9.1 Wachstumsbedingungen

Die Kultivierung der Zelllinien Caco-2, HCT 116, HEK-239T und SW480 erfolgte bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, das 10% fetal bovine serum (FCS) und 1% Penizillin/Streptomycin (s. Materialliste) enthielt. Die stabilen Klone der Zelllinien HCT und SW480 wurden ebenfalls bei 37°C und 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium,

versetzt mit Penizillin/Streptomycin (Endkonzentration: 1%) und FCS (Endkonzentration 10%) sowie G418 (200 µg/ml), kultiviert.

2.1.10 Nukleinsäurenachweis und Klonierung

2.1.10.1 RNA-Extraktion

Zelllysate

Die RNA der in 6-Well-Platten ausgesäten und konfluenten Zellen wurden mit Hilfe des peqGOLD Total RNA Kits (Qiagen GmbH) gemäß Herstellerprotokollangaben extrahiert. Die Lyse erfolgte mit je 350 µl des βmercaptoethanolhaltigen RNA-Lyse-Puffer T und 70% Ethanol in sterilem RNase-freiem dH₂O. Die weitere Aufbereitung erfolgte gemäß Herstellerprotokoll. Mit Hilfe der DNase I (Qiagen GmbH) wurden etwaige DNA-Verunreinigungen eliminiert und die aufgereinigte RNA in RNase-freiem Wasser bei -80°C konserviert.

Murine Gewebe

Die RNA-Extraktion aus murinem Gewebe erfolgte ebenfalls mit Hilfe des peqGOLD Total RNA Kits (Qiagen GmbH). Etwa 1-2 mm³ gefrorenen Gewebes wurden gemeinsam mit 600 µl des RNA-Lyse-Puffers T zunächst mit einem Homogenisator und anschließend mit Hilfe der QIAshredder zerkleinert. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben erwähnten.

2.1.10.2 cDNA-Synthese

Nach Konzentrationsbestimmung mit Hilfe des NanoDrop Spektrophotometers ND-1000 (PEQLAB Biotechnologie GmbH) wurde 1 µg RNA unter Verwendung des Verso cDNA Kits (Thermo Fisher Scientific, Inc.) gemäß Herstellerprotokoll via Reversetranskription-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Die mit RNase freiem Wasser auf 50 µl aufgefüllten Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.1.10.3 Polymerase-Kettenreaktion

Der Nachweis der MTMR7-cDNA erfolgte mit Hilfe des GoTaqGreen Master Mixes (Promega) nach folgendem Pipettierschema:

10 µM 3'Primer	2 µl
10 µM 5'Primer	2 µl
GoTaq Green Master Mix (2x)	10 µl
dH ₂ O	4 µl
cDNA	2 µl

Tabelle 8 PCR-Aufbau

Es wurden folgende Sequenzen als Primer verwendet:

hMTMR7	5'	TGCAGAAAATGCTGGAAGTG
	3'	CACTGCCTTTGCAATGAAGA

ChMTMR7	5'	ACAGCCAAAAGGAGAGACGA
	3'	GCTGGGCTCACTTTGCTTAC
NhMTMR7	5'	TGACGGCTACCCATGTCATA
	3'	AATGATTAGGGAGGCCCATC
mMTMR7	5'	CTGCAGGGAAAGGCTATGAG
	3'	CAGCCTGAGTTCTCCAGTCC

Tabelle 9 Primer

hMTMR7, ChMTMR7 und NhMTMR7 dienen dabei als Primer für humanes Gewebe, mMTMR7 als Primer für murines.

Das verwendete PCR-Programm war wie folgt aufgebaut:

Temp. [°C]	T [min]	Zyklen
94	5	1
94	0,5	40
55	0,5	
72	0,5	
72	5	1
4	∞	1

Tabelle 10 PCR-Programm

Es wurden Hybridisierungstemperaturen zwischen 50 und 65° ausgetestet, die besten Ergebnisse ließen sich bei 55°C erzielen.

2.1.10.4 Quantitative Echtzeit-PCR

Der quantitative Nachweis der MTMR7 mRNA-Expression erfolgte in verschiedenen murinen Geweben mit Hilfe der quantitativen Echtzeit-PCR.

H ₂ O	6 µl
Primer 3'	2 µl
Primer 5'	2 µl
LightCycler® 480 SYBR Green I Master (2x conc.)	10 µl
cDNA	2 µl

Tabelle 11 Aufbau Echtzeit-PCR

Wie oben dargestellt wurden 18 µl des Reagenziengemischs mit je 2 µl cDNA in je einem Well der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 durch 1-minütiges Rütteln bei 1000 rpm vermischt. Pro Probe wurden 2 Reaktionsgefäße befüllt. Die Quantifizierung der cDNA erfolgte mit Hilfe des folgenden PCR-Programms:

Temp. [°C]	T	Zyklen
95	5 min	1
95	10 s	45
55	10 s	
72	5s	
72	2	1
37	10	1

Tabelle 12 Echtzeit-PCR-Programm

Die Quantifizierung wird ermöglicht durch eine Bindung des Farbstoffs SYBR Green an PCR-Produkte, was durch Fluoreszenz zu einer messbaren Emission von Licht führt. Diese ist abhängig von der im Reaktionsgemisch vorliegenden DNA-Menge, die sich in jedem Zyklus der PCR erhöht. Dabei ist eine valide Messung der Lichtemission ausschließlich in der exponentiellen Phase der Reaktion, in der ideale Bedingungen herrschen, möglich.[168] Als Ausgangswert für die Quantifizierung der cDNA-Menge diente der cycle threshold (Ct)-Wert. Dieser wurde durch Berechnung des Mittelwerts der Probeduplikate jeweils für die zu untersuchende Sequenz (hier MTMR7) sowie eine Kontrollsequenz (hier β 2-Mikroglobulin) und anschließende Subtraktion der Mittelwerte für MTMR7 und β 2M ermittelt. Der Mittelwert aller Δ CT-Werten diente als Kalibrator, der von den einzelnen Δ CT-Werte subtrahiert wurde. Dieser $\Delta\Delta$ CT-Wert bildete die Grundlage für die Berechnung der Expression (Formel: $=\text{POTENZ}(2;-\text{DDCT})$) im Vergleich zur Kontrollsequenz angegeben als n-fache Expression.

2.1.10.5 Klonierung

Um MTMR7 in Zellen überexprimieren zu können, wurde die entsprechende Sequenz, gewonnen aus der cDNA von HEK293T-Zellen, in den pTarget Vektor (Promega) amplifiziert und integriert. Die verwendete PCR war wie folgt zusammengesetzt:

Reagenz	Volumen [μ l]
JumpStart RedTaq Ready Mix (Sigma)	25
5'Primer	2,5
3'Primer	2,5
H2O	15

Tabelle 13 PCR-Aufbau Klonierung

Das verwendete PCR-Programm verfügte über folgenden Aufbau:

Temp. [°C]	T [min]	Zyklen
95	2	1
95	0,5	40
60	0,5	
72	2,5	
72	7	1
4	∞	1

Tabelle 14 PCR-Programm Klonierung

Das in 1% Agarosegel aufgereinigte Produkt wurde ausgeschnitten und mit Hilfe des Gelextraktionskits (Qiagen) aufbereitet. Das so erzeugte Produkt wurde anschließend gemäß Herstellerprotokoll in den TOPO-Vektor integriert. Die entsprechende Reaktion war wie folgt aufgebaut:

Reagenz	Volumen [μ l]
PCR-Produkt	4,5
Salzlösung	1,0
TOPO-Vektor	0,5

Tabelle 15 Vektor-Integration

Die Reaktion verlief für fünf Minuten auf Eis. 4 μ l der Reagenz wurden mit auf Eis aufgetautem OneShot E. coli gemischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, anschließend für 30s auf 42°C erhitzt und dann wieder für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. 400 μ l SOC-Medium wurden hinzugefügt und die Bakterien für 1 Stunde bei 37°C und 300g inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Aussaat der Bakterien auf LB-Agar-Platten, die entweder mit Ampicillin oder Kanamycin behandelt waren. Durch diese Behandlung erfolgte die Amplifikation ausschließlich derjenigen Bakterien, die den ein Resistenzgen tragenden, funktionstüchtigen Vektor inkorporiert hatten. Zusätzlich zeigt eine Weißfärbung der Kolonien eine erfolgreiche Integration des PCR-Produktes in den TOPO-Vektor an. Nach 24h Inkubation wurden weiße Kolonien mit einer Pipettenspitze vom Agar abgenommen, die Spitze für 1h bei 37°C in LB-Medium unter Schütteln inkubiert. Gemäß der oben beschriebenen Zusammensetzung wurde eine PCR mit 5 μ l Bakterienlösung durchgeführt und bei positivem Signal die entsprechenden Klone über Nacht mit Ampicillin oder Kanamycin in LB-Medium inkubiert. Mit Hilfe des MiniPrep Kits der Firma Promega wurde ein Plasmid angefertigt und durch Sequenzierung validiert.

Anschließend erfolgte der Restriktionsverdau mit Hilfe des EcoRI Enzyms sowohl für das TOPO-Plasmid als auch für den pTarget-Vektor, gemäß folgendem Aufbau:

Reagenz	Volumen [μ l]
TOPO-Plasmid/pTarget	2
EcoRI	1
EcoRI-Puffer	1
H ₂ O	6

Tabelle 16 Restriktionsverdau

Das Produkt wurde auf einem 1% Agarosegel aufgereinigt und mit Hilfe des Gelextraktionskits aufbereitet. Die einzufügende Sequenz wurde gemeinsam mit dem Vektor im Verhältnis 3 zu 1 durch folgende Reaktion über Nacht bei 11°C ligiert:

Reagenz	Volumen [μ l]
T4 Ligase	1
T4-Puffer	1
Sequenz	30 ng
Vektor	10 ng

Tabelle 17 Ligierung

1 µl des Produkts wurde mit 50 µl E. coli DH5α versetzt und für 1 Stunde auf Eis inkubiert, anschließend für 90 Sekunden auf 42°C erhitzt und wieder für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Gemeinsam mit 500 µl LB Medium erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C und die anschließende Aussaat der Bakterien auf ampicillinbehandeltem LB-Agar-Platten. Durch PCR validierte Kolonien wurden selektiert und sequenziert, der aufgereinigte Vektor bei -20°C gelagert.

2.1.10.6 Transiente Transfektion der Zellen

Die entsprechenden Zellen (HCT116, SW480 und HEK293T) wurden in 6-Well-Platten ausgesät und kultiviert, bis etwa 70% Konfluenz erreicht waren. Es folgte die Transfektion in DMEM Medium mit 2 µg DNA/Vertiefung und TurboFect™ gemäß dem Herstellerprotokoll.

2.1.11 Beeinflussung von EGF- & Insulin-assoziierten Signalkaskaden, Zellwachstum und Dosis-Wirkungs-Analysen

2.1.11.1 Zellwachstum

Wirkstoff	Wirkprinzip	Ausgangskonzentration	Verwendete Konzentration
hEGF	Agonist am EGFR	50 µg/ml in dH ₂ O	50 nM
hInsulin	Agonist am Insulin-Rezeptor	1 mg/ml in dH ₂ O	50 ng/ml
Rosiglitazone	PPARγ-Agonist	50mM in DMSO	10 µM
U-0126	MEK1 & MEK2 Inhibitor	10 mM in DMSO	1 µM

Tabelle 18 Wirkstoffe und Konzentrationen Zellwachstum

Es wurden 2000 Zellen pro Vertiefung in 96-Well-Platten ausgesät und mit 100 µl des oben beschriebenen Mediums bedeckt. Um das vollständige Einwachsen der Zellen zu gewährleisten, fand die Inkubation über Nacht statt. Am nächsten Tag wurde die Behandlung mit dem den entsprechenden Wirkstoff enthaltenden Medium (s. Tabelle) durchgeführt. Es erfolgten die Inkubation für 0 bis 7 Tage und die Analyse per MTT-Test.

2.1.11.2 Dosis Wirkungs-Analyse

Es wurden 20000 - 40000 Zellen pro Vertiefung in 96-Well-Platten pipetiert und mit 100 µl des oben beschriebenen Mediums bedeckt. Um das vollständige Einwachsen der Zellen zu gewährleisten, erfolgte die Inkubation über Nacht. Die verwendeten Wirkstoffkonzentrationen (s. Tabelle) wurden den Zellen zugeführt, anschließend wurde die Inkubation für 3 Tage und die Analyse per MTT-Test durchgeführt.

Wirkstoff	Wirkprinzip	Ausgangskonzentration	Verwendete Konzentration
5-FU	Inhibitor des Nukleinsäurestoffwechsels	1 µg/ml in dH ₂ O	0,1 - 1 - 100 - 500 - 1000 µM

Cisplatin	DNA-Interkalation	1 µg/ml in dH ₂ O	1 - 10 - 20 - 50 - 100 - 200 -200 µM
Everolimus	mTORC1 & mTORC2 Inhibitor	1mM/ml in dH ₂ O	0 - 0,01 - 0,05 - 0,1-0,5 - 1 nM
Rosiglitazone	PPARγ-Agonist	50mM in DMSO	10 µM

Tabelle 19 Wirkstoffe Dosis-Wirkungs-Analyse

2.1.11.3 MTT-Test

Der gelbe, wasserlösliche Farbstoff 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) wird in Zellen NADH- und NADPH-abhängig in ein violettes, wasserunlösliches Formazan umgewandelt. Die Menge gebildeten Formazans ist durch die Abbildung der Funktion der Mitochondrien ein Maß für stoffwechselaktive, lebendige Zellen.

Nach Aussaat und Stimulation der Zellen in 100 µl Medium wurden 10 µl MTT-Reagenz (5mg/ml) zugefügt. Nach 3h Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 µl MTT-Lysepuffer (10% (w/v) SDS + 0,01 N HCl) pro Vertiefung gestoppt. Um eine vollständige Lyse der Zellen zu gewährleisten, wurden die 96-Well-Platten über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Quantifizierung der Färbeintensität erfolgte durch photometrische Messung der Extinktion bei 570 - 650 nm in einem 96-Well-Plattenleser.

2.1.12 Analyse des Insulin- und EGFR vermittelten PI3K- und ERK-Signaltransduktion

In 6-Well-Platten ausgesäte Zellen wurden kultiviert, bis etwa 90% Konfluenz erreicht waren, gefolgt von einer 48-stündigen Hungerphase mit Medium ohne Serum mit dem Ziel der Sensitivierung der Zellen gegenüber der anschließenden Stimulation mit EGF und Insulin oder Kombinationen der RTK-Agonisten und Rosiglitazone. Des Weiteren erfolgte die Stimulation mit dem PPARγ-Agonisten Rosiglitazone allein.

Wirkstoff	Wirkprinzip	Ausgangskonzentration	Verwendete Konzentration
hEGF	Agonist am EGFR	50 µg/ml in dH ₂ O	50 nM
hInsulin	Agonist am Insulin-Rezeptor	1 mg/ml in dH ₂ O	50 ng/ml
Rosiglitazone	PPARγ-Agonist	50mM in DMSO	10 µM

Tabelle 20 Wirkstoffe Signaltransduktion

2.1.12.1 Herstellung der Zelllysate

Nach Entfernung des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte für 20 Minuten auf Eis mit SDS-Lyse-Puffer (50nM Tris-HCl, pH 7,4 1% SDS + 1mM Natrium-Orthovanadat + 1mM Dithiothreitol + Protease Inhibitor Complete). Die Lysate wurden aus den 6-Well-Platten entnommen und in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Die Zellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen (10sec, 35%), für 10 min bei 4°C und 13200 rpm zentrifugiert und der Überstand gewonnen.

2.1.12.2 Western-Blot

Die Proteinkonzentration der Zellysate wurde gemäß Herstellerprotokoll mithilfe des BCA™ Protein Assay Kits (Thermo Fisher Scientific, Inc.) bestimmt. Die Proben wurden anschließend auf gleiche Proteinkonzentrationen verdünnt und mit 5x SDS-Ladepuffer (Bromphenolblau + 62,5 mM TRIS-base pH10 + 10% (w/v) SDS + 5% (v/v) β-Mecaptoethanol + 50% (v/v) Glycerol) für 10 Minuten bei 99°C erhitzt.

2.1.12.3 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Durch die Zugabe des anionischen Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) zu den Proteinproben (s.o.) werden nichtkovalente Bindungen der nativen Proteine gelöst sowie die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine aufgebrochen. Dies ermöglicht gemeinsam mit der Kopplung zwischen SDS und den Proteinen eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine rein nach Molekulargewicht, unabhängig von der physiologisch vorliegenden Struktur. Dabei dient das Polyacrylamid-Netzwerk des Gels gleichsam als Raster, das diese Trennung der Proteine ermöglicht. Der Acrylamidgehalt ist dabei ausschlaggebend für die Porengröße und die daraus resultierende Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine nach Anlage des elektrischen Feldes und unterscheidet sich je nach Größe des zu analysierenden Proteins. Entsprechend der Größe der analysierten Proteine zwischen 30 und 60 kD wurde ein Acrylamidgehalt von 10% gewählt. Die genaue Zusammensetzung des Gels ist nachfolgend beschrieben:

Reagenz	Sammelgel	Trenngel 10%
H ₂ O	1,53 ml	3,29 ml
Acrylamid (30%)	333 µl	2,8 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8		2,1 ml
0,5 M Tris-Hcl, pH 6,8	625 µl	
SDS (10%)	25 µl	83 µl
APS (10%)	12,5 µl	42 µl
TEMED	2,5 µl	2,8 µl

Tabelle 21 Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamidgels

19 µl der standardisierten Proteinproben wurden in eine Tasche des Sammelgels gegeben und mit Hilfe des Mini-PROTEAN 3 Cell Systems (Bio-Rad Laboratories GmbH) in Trennpuffer (25 mM TRIS-Base, 192 mM Glycin, 0,1% (w/v) SDS) bei 25 mA aufgetrennt.

2.1.12.4 Übertragung und Nachweis der Proteine

Mit Hilfe der Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transferzelle (Bio-Rad Laboratories GmbH) wurden die aufgetrennten Proteine durch Elektrophorese (1h, 100V) in Transferpuffer (192 mM glycine, 25 mM Tris-base, 20% (v/v) Methanol) auf eine Nitrozellulosemembran (Whatman) übertragen. Anschließend wurde die Membran für 1h in 5% (w/v) BSA in T-PBS bei Raumtemperatur auf einem Rütteltisch geblockt und über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (1:1000 in 5% BSA) ebenfalls auf einem Rütteltisch inkubiert. Nach erneutem Waschen (3x 20 min) in T-PBS wurde der peroxidasegekoppelte sekundäre Antikörper (Amersham Bioscience Europe GmbH) in einer Verdünnung von 1:5000 in 5% BSA für 1-2h hinzugefügt. Die Immundetektion erfolgte nach erneutem Waschen (T-PBS, 3x 20min) mit Hilfe des ECL Detektionsreagens (GE Healthcare UK Ltd.) entsprechend dem

Herstellerprotokoll. Sie wurde mit dem Lumineszenz-Analysegerät LAS1000 dokumentiert und mit Hilfe des Programms ImageJ Version 1.47v quantifiziert.

2.1.13 Immunhistochemie

Nach Auswaschen des Parafins der Schnitte in Histoclear, erfolgte die Rehydratation der Proben für 2x 3 Minuten in 100% Ethanol und je 3 Minuten in zunächst 96%, dann 70% Ethanol und dH₂O. Anschließend erfolgte die Antigendemaskierung in erhitzter Antigendemaskierungslösung (10 mmol/L Zitratpuffer (pH 6.0) für 10 Minuten in der Mikrowelle. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Schnitte für 3 mal 2 Minuten in PBS gewaschen und die Aktivität der endogenen Peroxidase durch zwanzigminütige Behandlung mit 3% H₂O₂ in PBS unterdrückt. Nach erneutem Waschen (s.o.) wurden die Proben für eine Stunde in einer Feuchtkammer bei Raumtemperatur mit Ziegenantiserum (5% in 1% BSA in PBS) geblockt. Die Primärantikörperkonzentration, die das beste Färbeergergebnis erzeugte, wurde ausgetestet und erwies sich als 1:100 für den verwendeten Antikörper (ab121222, Abcam). Der entsprechend in 1% BSA in PBS verdünnte Antikörper wurde auf die Proben getropft, diese mit Parafilm abgedeckt und in der Feuchtkammer bei 4°C über Nacht inkubiert.

Die Antikörperlösung wurde abgeklopft, die Objektträger drei Mal, wie oben beschrieben, gewaschen und der biotinylierte, sekundäre Kaninchenantikörper (Vectastain ABC Kit Peroxidase Rabbit IgG (Vectastain Laboratories) in einer Verdünnung von 1:500 in 1% BSA auf die Antikörper getropft und für eine Stunde mit Parafilm bedeckt in der Feuchtkammer bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde die ABC-Mischung (Vectastain Laboratories) nach Herstellerangaben vorbereitet. Nach erneutem Waschen (s.o.) wurde die ABC-Mischung auf die Objektträger getropft und diese für 30 Minuten bei Raumtemperatur in einer Feuchtkammer inkubiert. Nach erneutem Waschen erfolgte die Färbung mit dem DAB-Peroxidase-Substratkit zusammengestellt nach Herstellerprotokoll (Vectastain Laboratories) für 3-4 Minuten. Durch Waschen in dH₂O für 3x 1 Minute wurde die Reaktion terminiert. Es folgte die Gegenfärbung für wenige Sekunden mit Hämatoxylin. Überschüssige Farbe wurde durch Waschen in Leitungswasser entfernt. Zum Abschluss wurden die Schnitte in der - im Vergleich zur anfangs beschriebenen - umgekehrter Reihenfolge dehydriert und mit Hilfe eines Tropfens Eindeckmedium mit einem passenden Deckglas bedeckt.

2.1.14 Statistische Auswertung und Normalisierung

Die Daten wurden anschließend mit Hilfe des Programms GraphPad Prism Version 6.01 statistisch ausgewertet. Verwendete statistische Testverfahren waren gepaarte oder ungepaarte, ein oder zweiseitige T-Tests, die einfaktorielle ANOVA bei nicht gausverteilten Daten mit Kruskal-Wallis-Test oder mehrfaktorielle ANOVA mit Korrektur für zahlreiche Vergleiche nach Turkey, sowie die Multiple-T-Test-Methode mit Korrektur für zahlreiche Vergleiche nach der Holm-Sidak-Methode. Der jeweils verwendete Test ist in den Ergebnissen aufgeführt. Die Ergebnisse sind Resultate aus mindestens drei unabhängigen Versuchen entweder aus unterschiedlichen Passagen derselben Zelllinie, aus drei verschiedenen Zelllinien oder aus verschiedenen Zeitpunkten oder Konzentrationen einer Zelllinie und Zellpassage, wie im Ergebnisteil dargestellt.

Einen Sonderfall stellt die Auswertung einiger Western-Blot-Experimente dar: Hier wurde der Wert der Optischen Dichte (O.D.) der MTMR7-transfizierten Zellen von dem, zum entsprechenden Zeitpunkt passenden, mit einem Leervektor-transfizierten Zellen abgezogen und das Ergebnis mit dem ebenso weiterverarbeiteten, mit Rosiglitazone behandelten Zellen verglichen.

Die Normalisierung von O.D.-Werten der MTT-Assays erfolgte durch Division durch den Startwert, der somit als 100% definiert wurde. Zusätzlich wurde in einigen Fällen eine weitere Normalisierung auf den Prozentwert des entsprechenden Zeitpunkts der Leervektor-transfizierten Zellen durchgeführt. Die statistische Auswertung wurde dann für die Verhältnisse MTMR7/EV vs EV/EV berechnet.

3 ERGEBNISSE

3.1 MTMR7 Nachweis in murinen und humanen Geweben

Da die Gewebeverteilung von MTMR7 insbesondere bezüglich des Gastrointestinaltrakts bisher unbekannt war, wurde diese in einer Reihe von gastrointestinalen und extraintestinalen murinen und humanen Geweben auf mRNA-Ebene sowohl quantitativ als auch qualitativ mit Hilfe der RT-PCR sowie immunhistochemisch auf Proteinebene untersucht. Für den Nachweis auf mRNA-Ebene wurden drei verschiedene Primer entworfen und getestet, die wie von Majerus et al. beschrieben[136] sowohl die kodierende Sequenz für die 75,6 kDa- als auch für die 53,6 kDa schwere Isoform abdeckt, wobei sich die besten Ergebnisse mit dem Primerpaar hMTMR7 (Sequenz 5': TGCAGAAAATGCTGGAAGTG; Sequenz 3':CACTGCCTTTGCAATGAAGA) erzielen ließen, das nachfolgend für sämtliche PCR-Analysen verwendet wurde.

MTMR7 mRNA fand sich in allen analysierten murinen Proben des Gastrointestinaltraktes (Vormagen, Magen, oberer und unterer Dünndarmabschnitt, Caecum und Kolon), dem Hirn, den Ovarien sowie schwächer exprimiert in Leber und Niere (s. Abbildung 7 A).

In der quantitativen Analyse der Mäuse mit homo- oder heterozygoter $Lepr^{db}$ -Mutation fand sich eine signifikant höhere MTMR7-Expression im Gehirn, verglichen mit Gewebe aus Muskel, Kolon und Leber (s. Abbildung 7 C).

Zusätzlich fand sich in murinen Gewebeproben mit homozygoter $Lepr^{db}$ -Mutation sowie CaMK-Defizienz ein signifikant höheres MTMR7-mRNA-Niveau in Hirn (db/db: $7,638 \pm 0,6202$ N=5 vs db/-: $4,534 \pm 0,08463$ N=3, $p= 0,0096$; zweiseitiger T-Test) und Darmschleimhaut (db/db: $0,2817 \pm 0,02209$ N=5 vs. db/- $0,1296 \pm 0,01321$ N=4, $p= 0,0009$; zweiseitiger T-Test) als in den Proben von heterozygoten Kontrolltieren. (s. Abbildung 7 D)

Des Weiteren konnte MTMR7-mRNA sowohl in den humanen kolorektalen Karzinomzelllinien SW480 und HCT116, Caco und HT29 als auch im humanen, embryonalen Nierenzelllinienstamm HEK293T nachgewiesen werden (s. Abbildung 7 B).

Dabei zeigte sich, dass in SW480 Zellen scheinbar ein größerer Anteil der kurzen MTMR7-Variante, ohne „coiled-coil“-Heterodimerisierungsdomäne, vorliegt.

Auf Protein-Ebene konnte MTMR7 durch immunhistochemische Färbung in humanen Kolonepithelzellen, Hepatozyten und im Gefäßendothel nachgewiesen werden, die höchste Färbeintensität ließ sich jedoch in perivaskulärer glatter Muskulatur sowie in glatten Muskelzellen der Lamina Muscularis mucosae sowie der Tunica Muskularis erzielen (s. Abbildung 7 E).

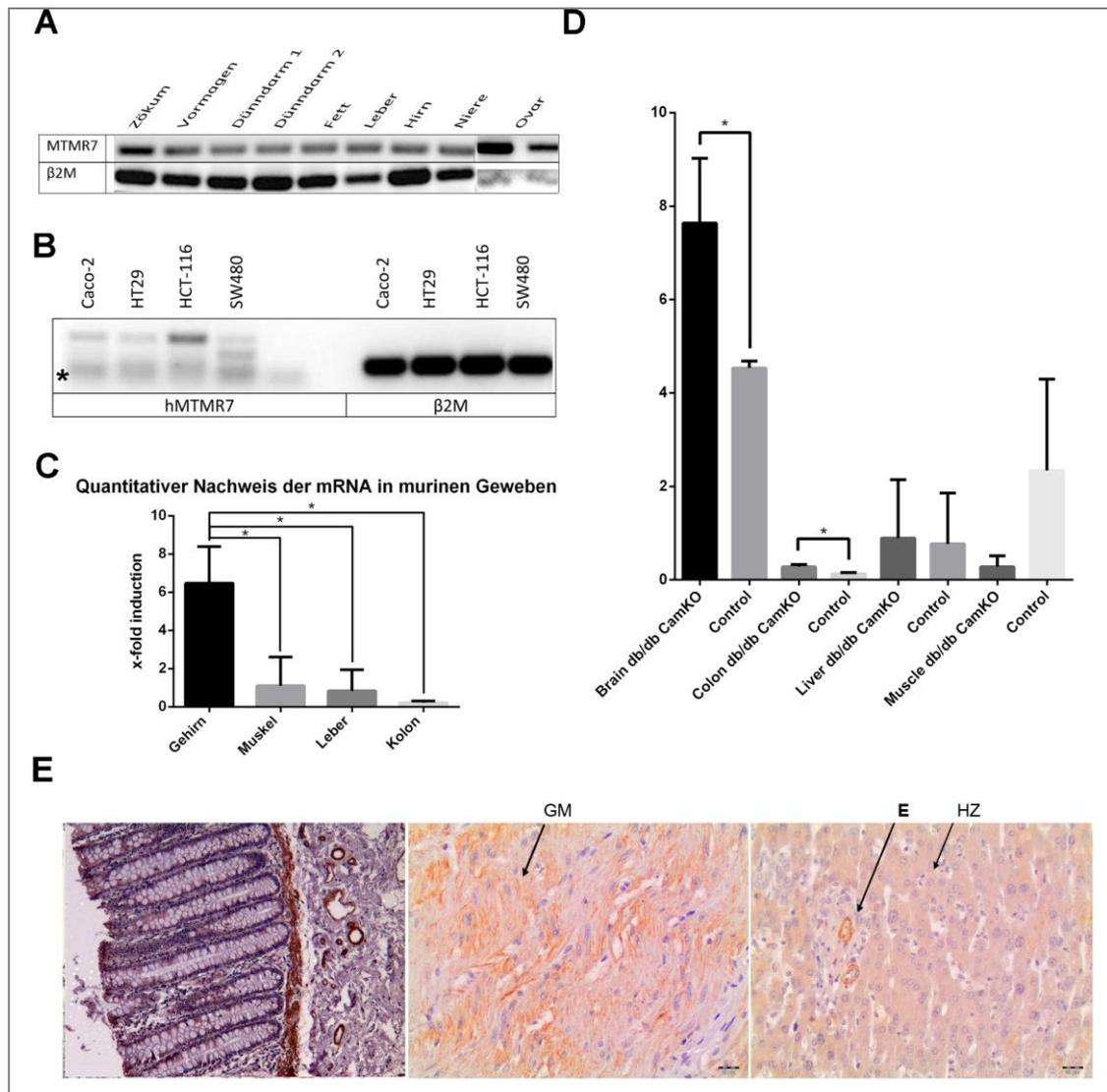


Abbildung 7. **A: MTMR7-Expression in murinen Gewebeproben** und **B: MTMR7-Expression in humanen kolorektalen Karzinomzelllinien**: Representative Agarose-Gele, auf dem die mRNA-Expression des MTMR7-Gens sowie die von β 2M als Positivkontrolle zur Darstellung kommt. Durchgeführt wurde eine konventionelle PCR. Mit einem Stern gekennzeichnet sind die unspezifischen Banden der Primer-Dimere. **C: Quantitativer Nachweis von MTMR7-mRNA in murinen Gewebeproben von Tieren mit homozygoter und heterozygoter Mutation des Leptinrezeptor-Gens**. Dargestellt ist die Quantifizierung eines Agarosegels einer RT-qPCR. Die CT-Werte wurden gegen β 2M-normalisiert. Es wurden sowohl für die Leptinrezeptormutation homo- als auch heterozygote Tiere gemeinsam ausgewertet. **D: Quantitativer Nachweis von MTMR7-mRNA in murinen Gewebeproben von Tieren mit homozygoter und heterozygoter Mutation des Leptinrezeptor-Gens**. Dargestellt ist die Quantifizierung eines Agarosegels einer RT-qPCR. Die CT-Werte wurden gegen β 2M-normalisiert. Die Werte von Tieren mit homozygoter Leptinrezeptormutation wurden gegen die mit heterozygoter Mutation aufgetragen. Deutlich wird das signifikant erhöhte MTMR7-mRNA-Expressionsniveau in den hyperinsulinämischen Tieren mit homozygoter Mutation des Leptinrezeptors **E: Immunhistochemische Analyse der MTMR7-Proteinexpression in humanen Gewebeproben**. Links benigne Kolonmukosa, in der Mitte glatte Muskulatur, rechts Lebergewebe. GM: glatte Muskulatur, E: Gefäßendothel, HZ: Hepatozyt .

3.1.1 Insulinresistenz beeinflusst die Expression von MTMR7-mRNA in murinem Gewebe.

In der Analyse humaner Gewebeproben zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der MTMR7-Protein-Expression zwischen benignem und malignen Gewebeproben von Patienten mit verstärktem Insulin oder IGF2-Signalling. Um den Einfluss der Insulinresistenz auch auf mRNA Ebene darzustellen wurden Proben 16 Monate alter Mäuse mit hetero- und homozygoter Mutation des Leptin-Rezeptor-Gens auf die MTMR7-mRNA-Expression hin untersucht. Tiere mit homozygoter Leptin-Rezeptor-Mutation weisen ein signifikant erhöhtes Serum-Insulinniveau im Vergleich zu heterozygoten Kontrolltieren auf [169,170], die metabolische Situation ist also derjenigen von Typ 2 Diabetikern bezüglich des Insulinsekretionsniveaus relativ ähnlich. Im Gegensatz zu den Veränderungen auf Protein-Ebene zeigte sich ein signifikant erhöhtes MTMR7-mRNA-Niveau in Hirn und Dickdarm der untersuchten Tiere (Kolon db/db: $0,2817 \pm 0,02209$ N=5 vs db/- $0,1296 \pm 0,01321$ N=4 $p=0,0009$; zweiseitiger T-Test; Hirn db/db: $7,638 \pm 0,6202$ N=5 vs. db/- $4,534 \pm 0,08463$ N=3). Insbesondere in den Geweben mit großem Einfluss auf die Glukosehomöostase – Leber und Muskel – zeigte sich kein Effekt der hyperinsulinämischen Stoffwechsellaage auf das MTMR7-mRNA-Niveau. (s. Abbildung 7 D)

3.2 Die Beeinflussung EGF- und Insulin-aktivierter Signalkaskaden durch MTMR7

Aufgrund der Beeinflussung der Aktivität der Ras- und MAPK-Signalwege durch PPAR γ -assoziierte Faktoren und der Manipulation der mTORC-Aktivität durch Myotubularine wurde die Hypothese formuliert, dass Bestandteile der PI3K-Signalwege genauso potentielle MTMR7-Ziele darstellen wie Faktoren der Ras-vermittelten Signaltransduktion. Der Ansatzpunkt, der zu diesem Zweck verfolgt wurde, war die Western-Blot-Analyse des Phosphorylierungsstatus` zentraler Faktoren der oben genannten Signalkaskaden mit und ohne Stimulation der entsprechenden Signalwege.

3.2.1 Charakteristika der verwendeten Zellsysteme

Die Grundaktivität ausgewählter Faktoren des PI3K-AKT-mTOR-S6K-Signalwegs wurde durch Western-Blot-Analyse unstimulierter HCT116, SW480 und HEK293T-Zellen nach 16h Serumentzug mit oder ohne Transfektion mit einem MTMR7-Expressionsvektor oder einem Leervektor (EV) analysiert. Zu diesem Zweck wurde der Phosphorylierungsgrad der AKT-Phosphorylierungsregionen an SER473 und THR308 genauso untersucht, wie die Phosphorylierung des S6 Ribosomalen Proteins.

Wie beschrieben stellt der Phosphorylierungsstatus des Aminosäurerests SER473 des AKT-Proteins einen Surrogatparameter für die positive Rückkopplung des MTORC2 auf AKT dar. Das Phosphorylierungsniveau dieses Rests war in HEK293T-Zellen gegenüber den beiden

kolorektalen Karzinomzelllinien² signifikant um den Faktor 10 erhöht (HEK293T/EV $2,059 \cdot 10^7 \pm 4,302 \cdot 10^6$ N=3 vs. HCT116&SW480/EV $1,523 \cdot 10^6 \pm 580638$ N=12 $p < 0,0001$; Abbildung 8 B; zweifacher ANOVA).

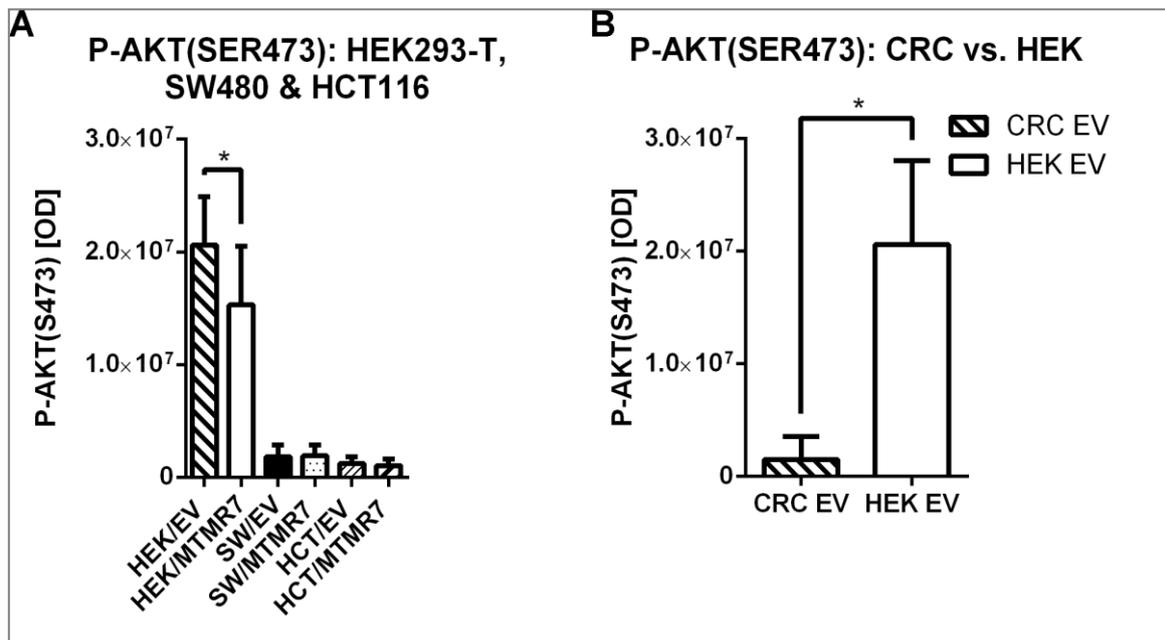


Abbildung 8. **A: Basales AKT-Phosphorylierungsniveau des Serinrests 473.** HEK293T [HEK], SW480-[SW] und HCT116[HCT] Zellen wurden für 48h mit Plasmiden transfiziert, die das MTMR7-Gen [/MTMR7] enthielten oder dem unveränderten Plasmid entsprachen. Quantifiziert wurde das basale AKT-Phosphorylierungsniveau ohne zusätzliche EGF oder Insulin-Stimulation. **B: Vergleich der beiden kolorektalen Karzinomzelllinien ohne MTMR7-Transfektion mit der Zelllinie HEK293.** Dargestellt ist erneut das basale AKT SER473-Phosphorylierungsniveau ohne zusätzliche Stimulation mit einem RTK-Liganden. Die Zellen wurden mit einem Leervektor transfiziert wie oben beschrieben.

Gleichzeitig zeigte sich ein etwa $26\% \pm 7,6\%$ ($n=3$, $p=0,0382$; gepaart, einseitiger T-Test)³ höherer Phosphorylierungsgrad der EV-transfizierten HEK293T-Zellen gegenüber den HEK293T-Zellen mit MTMR7-Überexpression, was einen inhibitorischen Effekt von MTMR7 auf die positive Rückkopplung von mTORC2 auf AKT bereits unter unstimulierten Bedingungen nahelegt.

Die basale AKT-SER473-Phosphorylierung der beiden kolorektalen Karzinomzelllinien unterschied sich nicht in Abhängigkeit vom MTMR7-Expressions-Status.

² Da es sich sowohl bei HCT116 als auch bei SW480 um kolorektale Karzinomzelllinien mit aktivierenden Ras-Mutationen handelt, die sich in Bezug auf den basalen AKT-Phosphorylierungsgrad nicht signifikant unterscheiden (s. Abbildung 8) erscheint die Gegenüberstellung in diesem Fall legitim. Zwar weist die Zelllinie HCT116 zusätzlich eine aktivierende Mutation der PI3K auf, dies schlug sich aber im vorliegenden Fall nicht in einer vermehrten AKT-Aktivierung nieder.

³ Wie sich in der Beschreibung der folgenden Experimente zeigen wird, führt die MTMR7-Überexpression im Allgemeinen zur Reduktion des AKT-Phosphorylierungsniveaus, deshalb erscheint in diesem Fall die einseitige Testung legitim.

Bezüglich der mTORC2-unabhängigen Phosphorylierung des THR308-Rests zeigte sich kein Unterschied zwischen den Zellen mit und ohne MTMR7-Expression. Die Betrachtung der Basalen S6-Protein-Phosphorylierung scheint das Ergebnis der AKT(SER473)-Phosphorylierung zu bestätigen. In den beiden Zelllinien mit der höchsten AKT(SER473)-Phosphorylierung – HEK293T und SW480 – ist das S6-Phosphorylierungsniveau in Zellen ohne künstlich erhöhten MTMR7-Gehalt etwa 4,5-fach höher als in MTMR7-transfizierten Zellen⁴. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den mit der Zelllinie HCT116 durchgeführten Experimenten ein eher erhöhtes basales P-S6 Niveau.

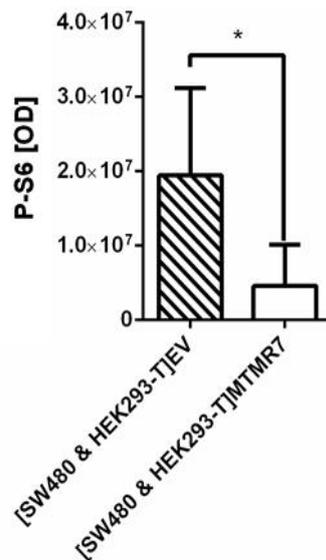


Abbildung 9. Das basale Phosphorylierungsniveau der beiden Zelllinien mit dem höchsten Maß an AKT-Aktivierung ist nach MTMR7-Überexpression signifikant vermindert. Dargestellt ist die Quantifizierung mehrerer Western-Blots mit Anti-P-S6-Antikörper. Zellen der Linien HEK293T und SW480 wurden mit MTMR7- oder Leervektor wie oben beschrieben transfiziert. Hierbei zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen MTMR7-überexprimierenden Zellen und denjenigen mit einem normalen Expressionsniveau. (HEK293T&SW480/EV vs MTMR7: $1,943 \times 10^7 \pm 0,5870 \times 10^7$ vs. $0,4578 \times 10^7 \pm 0,2781 \times 10^6$, $n=4$, $p=0,0227$ gepaart, zweiseitiger T-test)

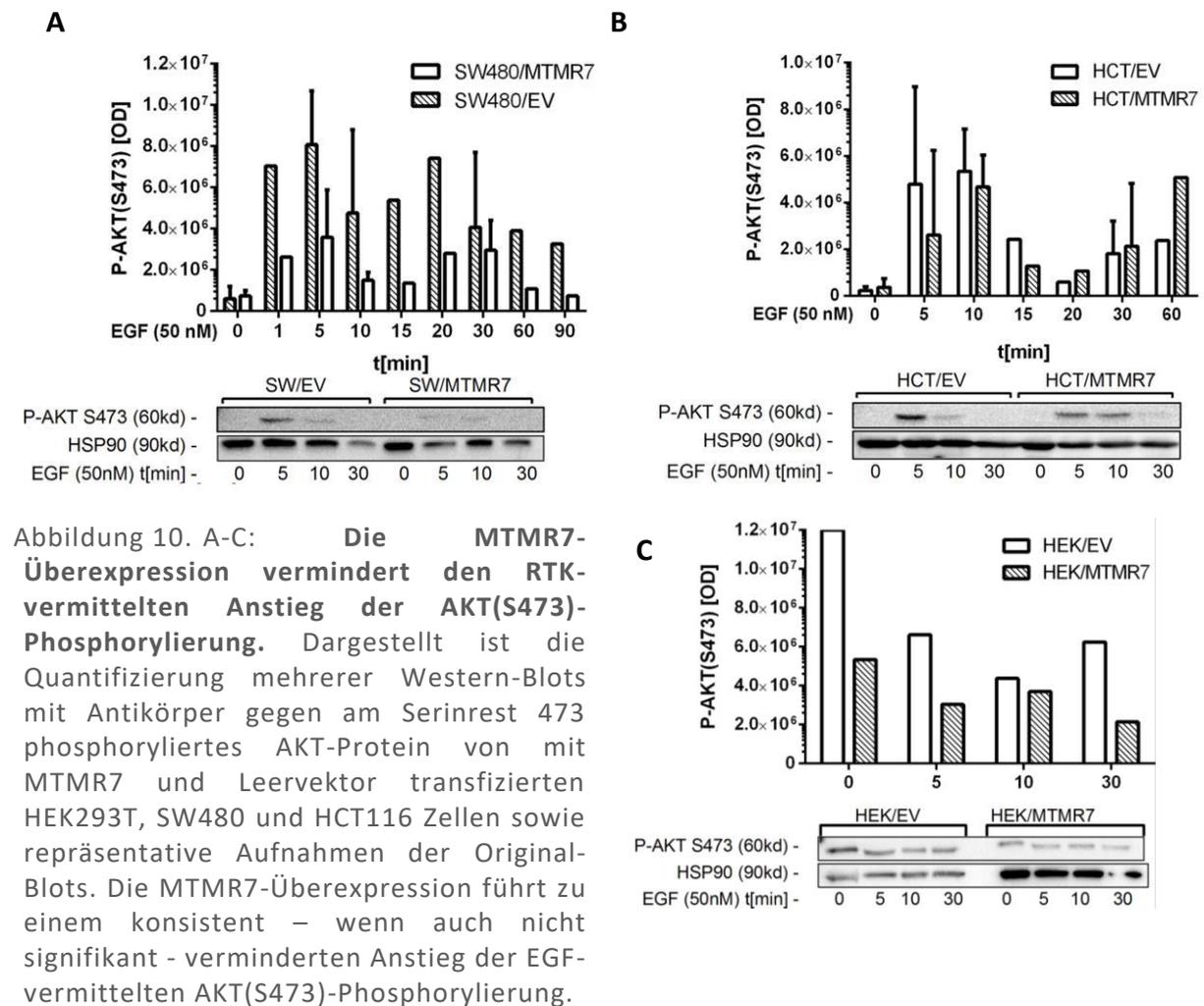
Bezüglich der Phosphorylierung von ERK1/2 zeigte sich kein signifikanter Unterschied, weder zwischen den Zelllinien noch in Bezug auf den MTMR7-Status. Passend zu den aktivierenden RAS-Mutationen wiesen die beiden kolorektalen Karzinomzelllinien ein höheres Grundniveau an ERK-Aktivierung auf.

3.2.2 MTMR7 hemmt die EGF-vermittelte Aktivierung der AKT-mTOR-Kaskade

Da der PTEN-Verlust und die daraus resultierende vermehrte PI3K-Aktivität ein häufiges Ereignis im kolorektalen Karzinom darstellt, wurde der Einfluss von MTMR7 auf die AKT-

⁴ Die geringe Anzahl der Wiederholungen macht ein Zusammenfassen der beiden Zelllinien, die ähnliches Verhalten zeigen, zur statistischen Auswertung nötig, auch wenn dies die Aussagekraft der Analyse erheblich schmälert.

Aktivierung und S6-Phosphorylierung nach Stimulation der Signalkaskade mit 50nM EGF für eine bis 60 Minuten mit Hilfe der Western-Blot-Methode untersucht. Die AKT(SER473)-Phosphorylierung betreffend zeigte sich ein durchweg niedrigeres Phosphorylierungsniveau zu allen Zeitpunkten in SW480 und HEK293T-Zellen sowie zu den die ersten 30 Minuten umfassenden Stimulationszeitpunkten in HCT116 Zellen. Der stärkste Effekt zeigte sich in SW480 Zellen nach 5 Minuten Stimulation. In diesem Fall erreichte das Phosphorylierungsniveau der MTMR7-transfizierten Zellen nur 44% des Niveaus der Kontrollgruppe (SW/EV: $8,073 \cdot 10^6 \pm 1,836 \cdot 10^6$ n=2 vs SW/MTMR7: $3,585 \cdot 10^6 \pm 2,286 \cdot 10^6$ n=2; p=0,0958; zweiseitiger T-Test).



Mit Blick auf die THR308-Phosphorylierung, dem Surrogatparameter für PI3K-PDK-vermittelte AKT-Aktivierung, zeigte sich ein ähnliches Bild. Ein signifikanter Unterschied konnte in der Analyse der zusammengefassten kolorektalen Zelllinien, 5 Minuten nach EGF-Stimulation ermittelt werden. Zu diesem Zeitpunkt war das Phosphorylierungsniveau EV-transfizierter Zellen 13,36-fach höher als das der MTMR7-transfizierten Gegenstücke.

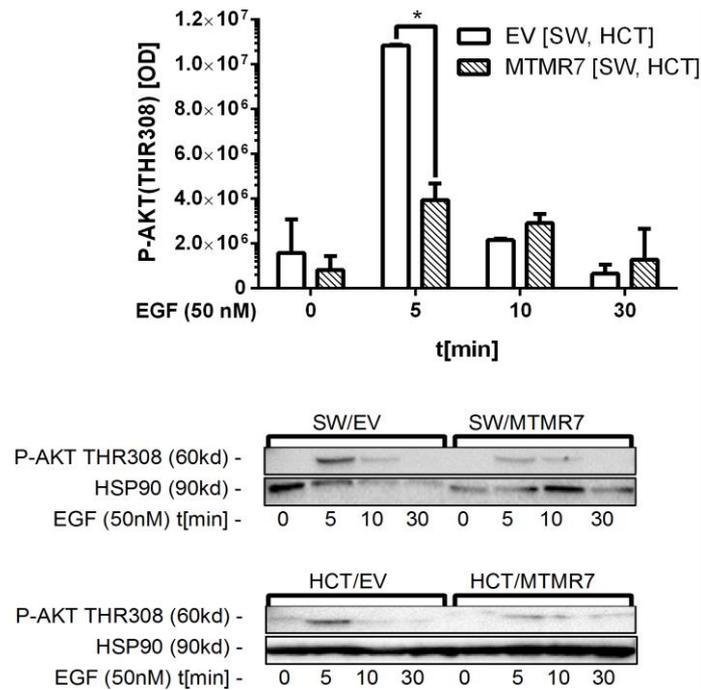


Abbildung 11. **MTMR7-Überexpression führt zu einer signifikant verminderten Phosphorylierung des THR308-Rests des AKT-Proteins.** Dargestellt ist die Quantifizierung mehrerer Western-Blots mit Antikörper gegen am Threonin 308 phosphoryliertes AKT-Protein von mit MTMR7 und Leervektor transfizierten SW480 und HCT116 Zellen sowie repräsentative Aufnahmen der Original-Blots. Die MTMR7-Überexpression führt zu einem signifikant verminderten Anstieg der EGF-vermittelten AKT(THR308)-Phosphorylierung. (*HCT&SW/EV: $1,085 \cdot 10^7 \pm 34330$ n=2* vs. *HCT&SW/MTMR7: $0,3945 \cdot 10^7 \pm 0,0515389 \cdot 10^7$ n=2; p= 0.0056; zweiseitiger T-Test*)

HEK293T-Zellen zeigten sich bezüglich der AKT(SER473)- und AKT(THR308)- Phosphorylierung unempfindlich gegenüber der EGF-Stimulation und wurden, obwohl auch in diesem Fall das Phosphorylierungsniveau in MTMR7-transfizierten Zellen niedriger war, nicht in die Berechnung mit einbezogen.

Der Effekt des MTMR7-Proteins auf die S6-Phosphorylierung verhielt sich entsprechend. Das S6-Phosphorylierungsniveau war in allen 3 Zelllinien zu allen Zeitpunkten deutlich niedriger nach MTMR7-Überexpression verglichen mit den EV-transfizierten Kontrollgruppen (s. Abbildung 12 A, B, C)

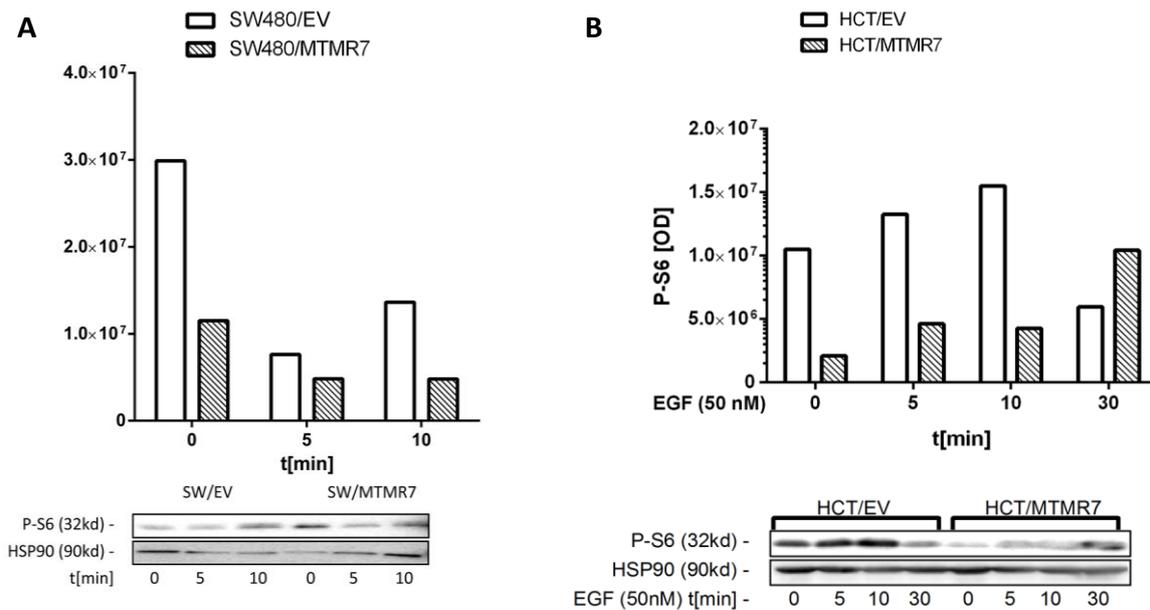
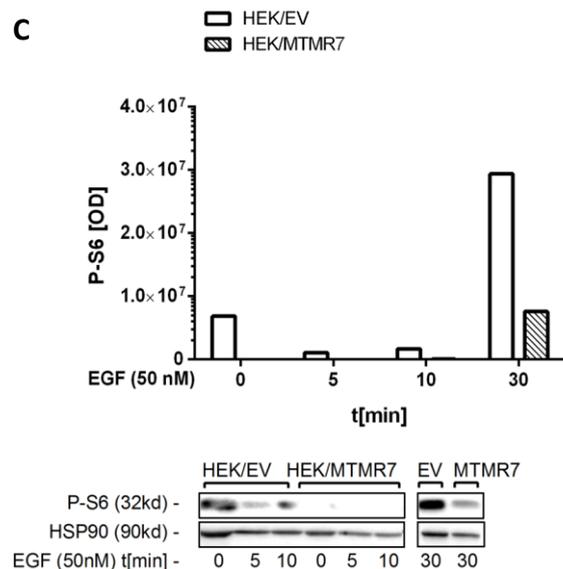


Abbildung 12. : **MTMR7-Überexpression führt zu einer konsistent verminderten Phosphorylierung des ribosomalen S6 Proteins.** Dargestellt ist die Quantifizierung mehrerer Western-Blots mit Antikörper gegen phosphoryliertes, ribosomales S6 Protein von mit MTMR7 und Leervektor transfizierten SW480 (A), (B) HEK293T und HCT116 Zellen (C) sowie repräsentative Aufnahmen der original Blots. Die MTMR7-Überexpression führt zu einem konsistent verminderten Anstieg der EGF-vermittelten Phosphorylierung des S6 Proteins



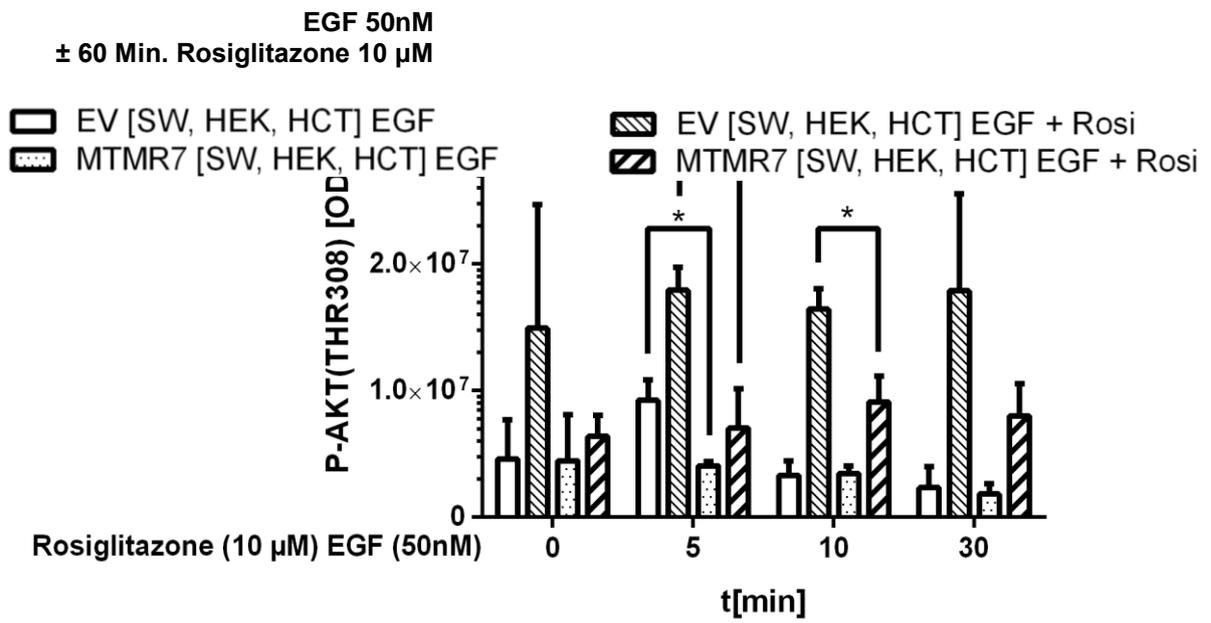
3.2.3 Der PPAR γ -Ligand Rosiglitazone verstärkt die MTMR7-abhängige Hemmung der EGF-aktivierten AKT-mTORC-Kaskade

Vergleicht man die Effektstärke der MTMR7-Überexpression auf die Aktivität der AKT-mTORC-Kaskade, so scheint diese in SW480 Zellen am größten zu sein, derjenigen Zelllinie, die die höchste endogene Ras-Aktivität und das höchste Niveau an zytoplasmatischem PPAR γ der drei Zelllinien aufweist. Unter der Annahme, dies führe zu einer vermehrten Komplexformation mit MTMR7, stellte sich die Frage, inwieweit PPAR γ -Agonisten wie Rosiglitazone die MTMR7-Aktivität beeinflussen. Wie T. Friedrich in CoIP-Experimenten festgestellt hatte, führte eine Inkubation mit PPAR γ -Agonisten zu einer verstärkten PPAR γ /MTMR7-Komplex-Bildung. Dieser Effekt war nach 60 Minuten am stärksten.

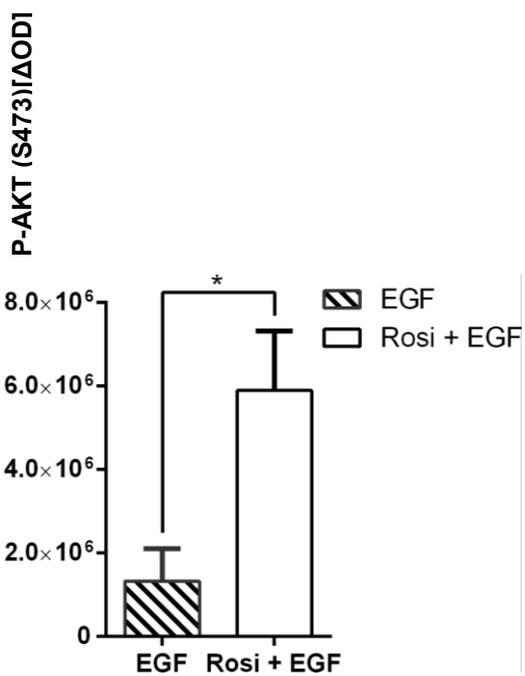
Aus diesem Grund wurden die Zellen vor Stimulation mit EGF (50nM) für eine Stunde mit 10 μ M Rosiglitazone inkubiert.

Unter diesen Bedingungen konnte in der Analyse der drei zusammengefassten Zelllinien ein signifikant niedrigeres AKT(THR308)-Phosphorylierungsniveau in MTMR7-transfizierten Zellen nach 5 und 10 Minuten EGF-Stimulation festgestellt werden (Abbildung 13 A). Derselbe Effekt zeigte sich auch für die SER473-Phosphorylierung nachweisen (t=5 min: SW,HEK,HCT/EV: $1,386 \cdot 10^7 \pm 0,3223 \cdot 10^7$ n=3 vs. SW,HEK,HCT/MTMR7: $0,5063 \cdot 10^7 \pm 409197$, n=3, p= 0,0090; zweiseitiger T-Test; t=10 min: SW,HEK,HCT/EV $1,117 \cdot 10^7 \pm 0,3032 \cdot 10^7$ N=3 vs $0,4332 \cdot 10^7 \pm 0,0877041 \cdot 10^7$ N=3, p= 0,0346 ; zweiseitiger T-Test). Des Weiteren zeigte es sich, dass die Präinkubation mit Rosiglitazone zu einer Verstärkung der MTMR7-abhängigen Hemmung der AKT-Phosphorylierung führte. Die Differenz zwischen dem Phospho-AKT-Niveau der Zellen mit modifiziertem und unmodifizierten MTMR7-Gehalt war nach Präinkubation mit Rosiglitazone signifikant größer, sowohl was die SER473- als auch was die THR308-Phosphorylierung betrifft.

A



B



C

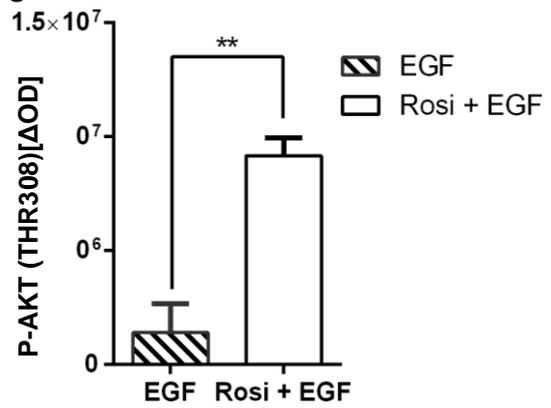
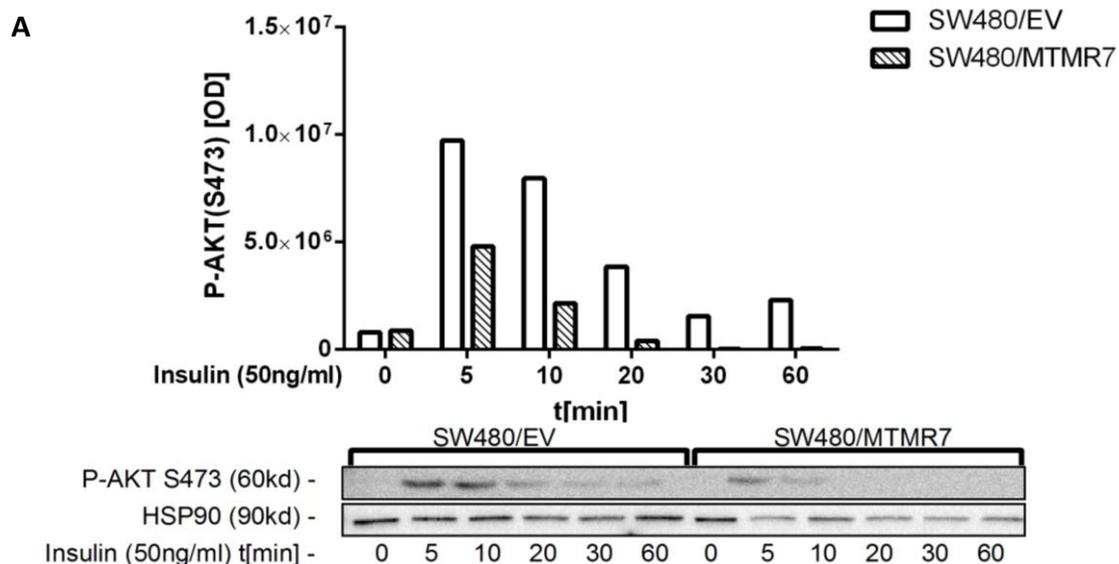


Abbildung 13. Eine sechzigminütige Vorbehandlung mit Rosiglitazone führt zu einer Verstärkung der MTMR7-assoziierten Effekte auf die PI3K-vermittelte Signalkaskade. Dargestellt ist die Quantifizierung von Western-Blots mit Anti-P-AKT(THR308)-Antikörper von Proteinlysaten von mit MTMR7 und Leervektor transfizierter Zellen. A Ein signifikant niedrigeres Phosphorylierungsniveau findet sich nach Vorbehandlung nicht nur nach 5 (SW,HEK,HCT/EV: $1,793 \cdot 10^7 \pm 0,18 \cdot 10^7$ vs. SW,HEK,HCT/MTMR7: $0,7038 \cdot 10^7 \pm 0,3128 \cdot 10^6$ $p=0,0064$, $n=1$ pro Zelllinie; zweiseitiger T-Test), sondern auch nach 10 Minuten EGF-Stimulation (SW,HEK,HCT/EV: $1,643 \cdot 10^7 \pm 0,1632 \cdot 10^6$ vs. SW,HEK,HCT/MTMR7: $0,9105 \cdot 10^7 \pm 0,2039 \cdot 10^6$ $p=0,0083$, $n=1$ pro Zelllinie; zweiseitiger T-Test). Über alle Zeitpunkte und Zelllinien hinweg führt die Präinkubation mit Rosiglitazone zu einer signifikanten Zunahme der Differenz des Phosphorylierungsniveaus zwischen den mit MTMR7 und Leervektor transfizierten Zellen sowohl bezüglich der THR308- als auch der SER473- Phosphorylierung. (THR308: Differenz (HCT, SW, HEK: EGF), EV-MTMR7 zusammengefasst: $1,407 \cdot 10^6 \pm 1,260 \cdot 10^6$ $n=12$ vs. Differenz (HCT, SW, HEK: EGF + Rosi), EV-MTMR7 zusammengefasst: $9,156 \cdot 10^6 \pm 0,777462 \cdot 10^6$ $n=12$; SER473: $1,328 \cdot 10^6 \pm 0,773407 \cdot 10^6$ $n=24$ vs. $5,892 \cdot 10^6 \pm 1,428 \cdot 10^6$ $n=12$)

3.2.4 MTMR7 hemmt die Insulin-vermittelte Aktivierung der AKT-mTOR-Kaskade

Die zentrale Rolle der PI3K-AKT-mTORC-Kaskade in der insulinvermittelten Signaltransduktion ließ einerseits die Frage nach der Beeinflussung eben dieser durch MTMR7 aufkommen, gleichzeitig bot sich durch die Stimulation eines anderen RTK-Rezeptors als des EGF-aktivierten die Möglichkeit allgemeinerer Schlussfolgerungen näher zu kommen.



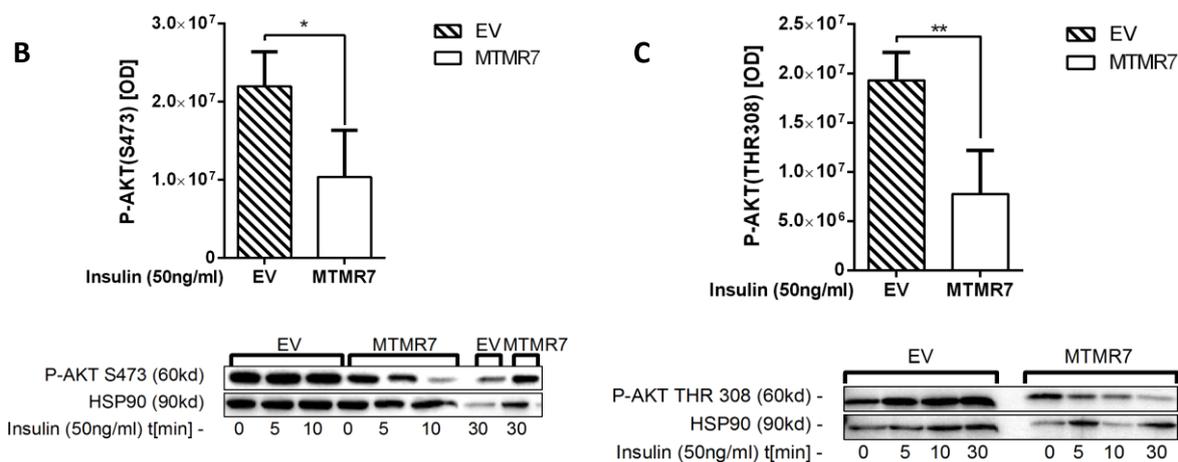


Abbildung 14. **MTMR7 hemmt die Insulin-vermittelte AKT-Aktivierung.** **A** repräsentativer Western-Blot mit Anti-P-AKT(SER473)-Antikörper, HSP90-Abgleich sowie die entsprechende Quantifizierung nach unterschiedlich langer Stimulation mit 50ng/ml Insulin. Deutlich wird das konsistent niedrigere Phosphorylierungsniveau in MTMR7-überexprimierenden Zellen der Zelllinie SW480. **B und C:** repräsentative Western-Blots mit Anti-P-AKT(SER473)- und Anti-P-AKT(THR308)-Antikörper, HSP90-Abgleich sowie die statistische Auswertung der Quantifizierung über alle Stimulationszeitpunkte hinweg in HEK293T-Zellen. Auch hier zeigt sich ein signifikant niedrigeres AKT-Phosphorylierungsniveau in MTMR7-überexprimierenden Zellen sowohl bezüglich des Aminosäurerests S473 (*HEK/EV* $2,196 \cdot 10^7 \pm 0,2207 \cdot 10^7$ $N=4$ vs. *HEK/MTMR7* $1,037 \cdot 10^7 \pm 0,2994 \cdot 10^7$ $N=4$ $p=0,0206$) als auch was die Aminosäure THR308 betrifft (*HEK/EV* $1,929 \cdot 10^7 \pm 0,1416 \cdot 10^7$ $N=4$ vs *HEK/MTMR7* $0,7753 \cdot 10^7 \pm 0,2211 \cdot 10^7$ $N=4$ $p=0,0046$; zweiseitiger T-Test)

Die AKT(SER473)-Phosphorylierung zeigte sich in SW480 Zellen mit MTMR7-Überexpression konstant reduziert[171].

Der gleiche Effekt fand sich in HCT116-Zellen nach 5 und 10 Minuten[171]. Die Zelllinie HEK293T verhielt sich nach Insulinstimulation ähnlich, wie für die Stimulation mit EGF beschrieben. Von einem bereits hohen basalen Phosphorylierungsniveau ausgehend folgte der Stimulation mit dem RTK-Liganden keine weitere Aktivierung, sondern eine Reduktion des Phosphorylierungsniveaus. Dieses Verhalten fand sich sowohl für die AKT(SER473) als auch für die Phosphorylierung an Threoninrest 308. Gleichzeitig fiel diese in beiden Fällen bei Betrachtung über alle Zeitpunkte hinweg in MTMR7-überexprimierenden Zellen signifikant geringer aus als in den EV-transfizierten Kontrollen

Zudem ließ sich die reduzierte Aktivität der AKT-mTORC-Achse auch auf der nachgeschalteten Ebene der S6-Proteinphosphorylierung signifikant nachweisen ($2,399 \cdot 10^7 \pm 0,02469 \cdot 10^7$ $N=4$ vs. $0,7833 \cdot 10^7 \pm 0,1554 \cdot 10^7$ $N=4$ $p=0,0015$; zweiseitiger T-Test).

Gleiches gilt für die S6-Phosphorylierung der beiden kolorektalen Karzinomzelllinien: fasst man die Kinetiken beider Zelllinien zusammen, so ergibt sich eine signifikante Reduktion der S6-Phosphorylierung nach 5 und 30 Minuten Insulinstimulation[171] (s. Abbildung 15).

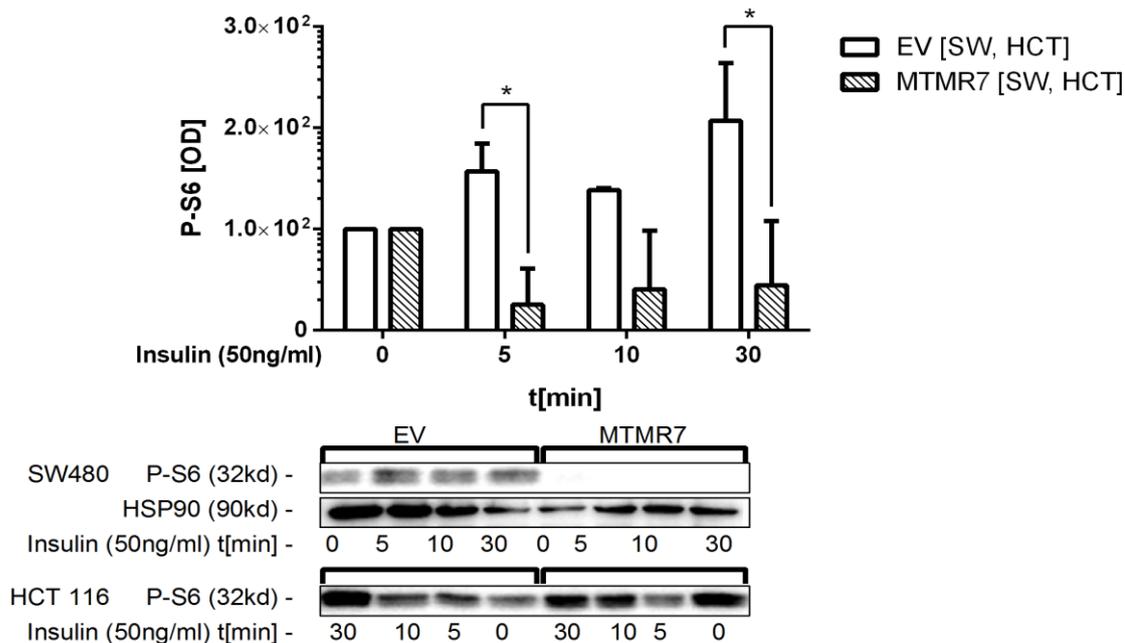


Abbildung 15. **MTMR7 hemmt die Insulin-vermittelte Phosphorylierung des ribosomalen S6-Proteins in kolorektalen Karzinomzelllinien.** Repräsentative Western-Blots mit Anti-Phospho-S6-Antikörper und HSP90-Abgleich sowie deren Quantifizierung. Deutlich wird das signifikant niedrigere Phosphorylierungsniveau in MTMR7-überexprimierenden Zellen nach 5 und 10 Minuten ($t=5 \text{ min: HCT\&SW/EV } 157,1\% \pm 27,54\% \text{ } N=2 \text{ vs. HCT\&SW/MTMR7 } 25,35\% \pm 25,35\% \text{ } n=2 \text{ } p= 0.0202$; zweiseitiger T-Test; $t=10 \text{ min: HCT\&SW/EV } 138,5\% \pm 2,129\% \text{ } n=2 \text{ vs. HCT\&SW/MTMR7 } 40,70\% \pm 40,70\% \text{ } n=2 \text{ } p= 0.06413$; zweiseitiger T-Test; $t=30 \text{ min HCT\&SW/EV } 207,1 \pm 57,00 \text{ } n=2 \text{ vs. HCT\&SW/MTMR7 } 44,67\% \pm 44,67\% \text{ } n=2 \text{ } p=0.0074$; zweiseitiger T-Test)⁵

Insgesamt lässt sich also festhalten, dass MTMR7-Überexpression zu einer verminderten Aktivierung der AKT-mTORC-Kaskade sowohl nach Stimulation mit EGF als auch mit Insulin führt.

3.2.5 MTMR7 hemmt die EGF- und Insulin-aktivierte ERK1/2-Signalkaskade

Die Grundlage für die Analyse des PI3K-AKT-mTORC-Signalwegs bildete die Beeinflussung dieser Signalkaskade durch andere Myotubularine und MTMRs. Die oben beschriebene enge Verbindung zwischen PPAR γ -Regulation und ERK-Signaltransduktion und die Herabregulation der Ras-Aktivität in Folge aktiven, nukleären PPAR γ -Proteins führte zur Hypothese der Beeinflussung der ERK-Aktivität durch den PPAR γ -Bindepartner MTMR7.

Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe von Western-Blots sowohl das basale ERK-1/2-Phosphorylierungsniveau untersucht als auch das Phosphorylierungsniveau nach Stimulation

⁵ Angesichts der geringen Anzahl an Wiederholungen ist das Ergebnis unter Vorbehalt zu bewerten, betrachtet man jedoch das Verhalten nach EGF Stimulation, scheint die Aussage valide. Die Standardabweichung in Höhe des Messwerts kommt durch die vollständige Suppression der S6-Phosphorylierung in einem Experiment zustande.

mit den RTK-Liganden EGF und Insulin und nach Präinkubation mit Rosiglitazone und nachfolgender RTK-Aktivierung.

Bezüglich des basalen Phosphorylierungsniveaus konnte kein signifikanter Unterschied im Phosphorylierungsniveau der MTMR7- oder EV-transfizierten HCT116, SW480 oder HEK293T-Zellen gefunden werden.

Dies betrifft sowohl die Betrachtung der einzelnen Zelllinien als auch der zusammengefassten Zelllinien (HCT,SW480,HEK/EV: $8,546 \cdot 10^6 \pm 1,939 \cdot 10^6$ n=10 vs. HCT,SW480,HEK/MTMR7: $8,494 \cdot 10^6 \pm 2,186 \cdot 10^6$ n=10 p=0.9861; zweiseitiger T-Test). Gleichzeitig unterschied sich das Phosphorylierungsniveau der einzelnen Zelllinien deutlich, wenn auch nicht signifikant, und verhielt sich dem von AKT entgegengesetzt.

Das höchste Grundniveau fand sich in HCT116-Zellen, gefolgt von dem der ebenfalls KRAS-mutierten Zelllinie SW480, während HEK293T-Zellen gerade noch 22% bzw. 40% des basalen Phospho-ERK1/2-Niveaus der HCT116-Zellen aufwiesen.

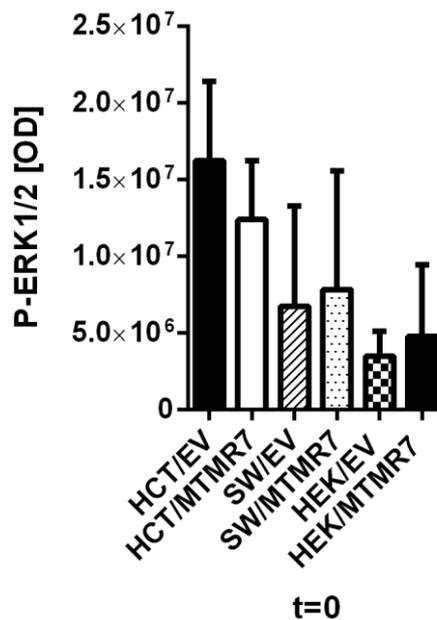


Abbildung 16. **Basales ERK1/2 Aktivitätsniveau der drei untersuchten Zelllinien im Vergleich.** Quantifizierung von Western-Blots mit Anti-Phospho-ERK1/2-Antikörper ohne EGF/Insulin-Stimulation. In den beiden kolorektalen Karzinomzelllinien mit aktivierender Ras-Mutation findet sich das höchste ERK1/2-Aktivitätsniveau. Einen signifikanten Unterschied zwischen Zellen mit MTMR7-Transfektion und unbeeinflusstem MTMR7-Expressionsniveau findet sich nicht (HCT116/EV: $1,622 \cdot 10^7 \pm 0,2578 \cdot 10^7$ n=4; HCT116/MTMR7: $1,239 \cdot 10^7 \pm 0,1926 \cdot 10^7$ n=4, SW480/EV: $0,7828 \cdot 10^7 \pm 0,3877 \cdot 10^7$ n=4; SW480/MTMR7: $0,7828 \cdot 10^7 \pm 0,3877 \cdot 10^7$ n=4, HEK293T/EV: $0,3508 \cdot 10^7 \pm 0,1140 \cdot 10^7$ n=2, HEK293T/MTMR7: $0,4795 \cdot 10^7 \pm 0,3282 \cdot 10^7$ n=2).

Die Stimulation der gehungerten Zellen mit dem RTK-Liganden EGF führte nicht nur zu einem allgemeinen Anstieg des ERK1/2-Phosphorylierungsniveaus. In MTMR7-überexprimierenden Zellen fiel dieser Anstieg auch deutlich geringer aus mit einem signifikanten Unterschied nach

5 Minuten EGF-Stimulation (SW, HCT, HEK/EV: $3,502 \cdot 10^7 \pm 0,3983 \cdot 10^7$ n=3 vs. SW,HCT,HEK/MTMR7: $1,58 \cdot 10^7 \pm 0,53 \cdot 10^7$ n=3, p=0.04) (Abbildung 17). Im Fall von Insulin fiel der erwartete Anstieg der Phosphorylierung nach MTMR7-Transfektion erheblich geringer aus als nach Stimulation der EV-transfizierten Zellen, war nach 10 Minuten Stimulation signifikant niedriger und insgesamt im Vergleich zur EGF-Stimulation – wenn auch nicht signifikant – reduziert[171].

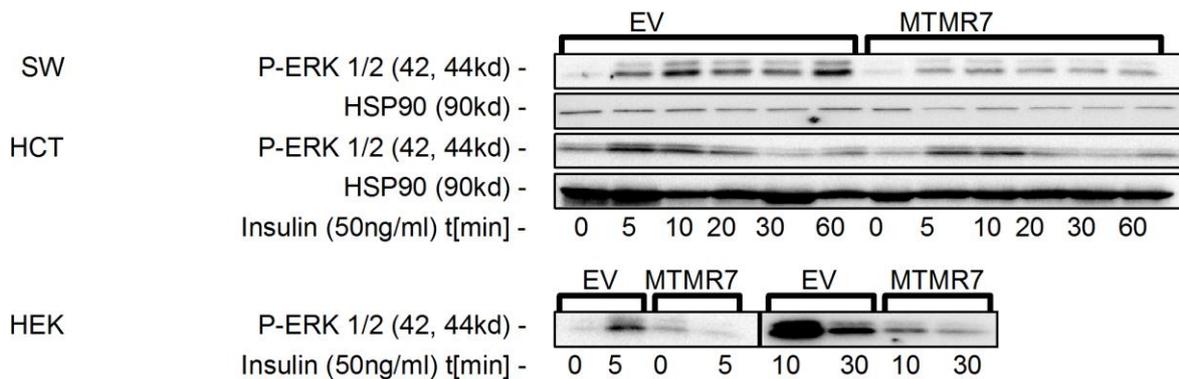
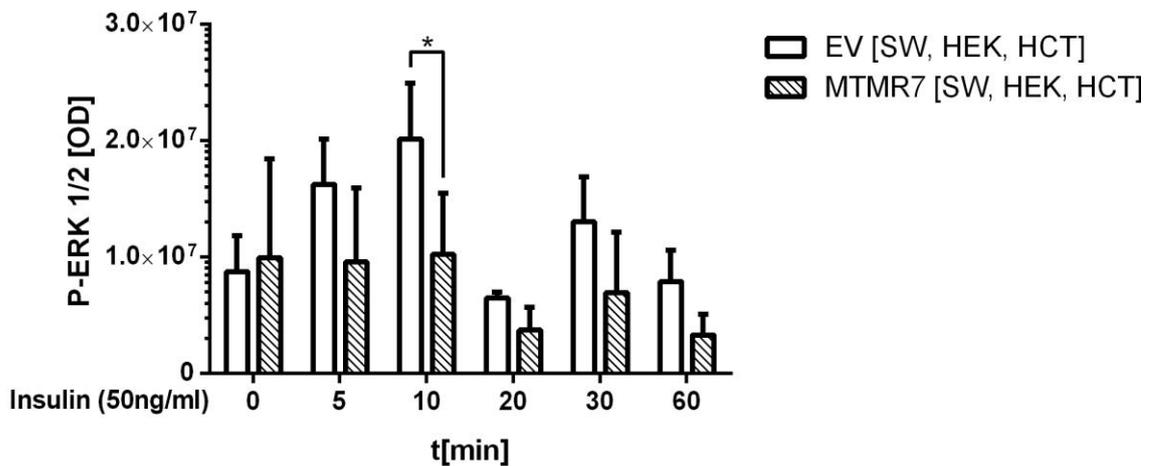


Abbildung 17. **MTMR7-Überexpression führt zu einer signifikant verringerten ERK1/2-Phosphorylierung nach Insulinstimulation.** Dargestellt sind repräsentative Western-Blots, Quantifizierung und statistische Auswertung MTMR7-überexprimierender Zellen und den entsprechenden Kontrollen. Erkennbar ist die signifikant niedrigere ERK1/2-Phosphorylierung nach 10 Minuten Insulinstimulation (SW,HCT,HEK/EV: $2,013 \cdot 10^7 \pm 0,4801 \cdot 10^7$ n=5 vs. SW,HCT,HEK/MTMR7: $1,022 \cdot 10^7 \pm 0,2347 \cdot 10^7$ n=5; p= 0.0397; zweiseitiger T-Test).

Wie im Fall der AKT-Phosphorylierung führte die Präinkubation der Zellen mit dem PPAR γ -Agonisten Rosiglitazone zu einem Trend zu einer verstärkten Minderung der Phosphorylierung von ERK1/2 nach Insulin-Stimulation (Abbildung 18 A), auch wenn dieser Effekt weniger stark ausfiel als im Fall von AKT und im Fall der EGF-Stimulation in den MTMR7-überexprimierenden Zellen sogar geringer ausfiel als in den Kontrollzellen (Abbildung 18 B). Gleichzeitig zeigte sich jedoch im Fall der Insulin-stimulierten Zellen zu jedem Stimulationszeitpunkt ein signifikanter Unterschied zwischen den MTMR7-transfizierten Zellen und der Kontrollgruppe (Abbildung 18 C), ebenso nach 5 Minuten EGF-Stimulation (EGF: t=5 SW, HCT, HEK/EV: $2,227 \cdot 10^7 \pm 0,5522 \cdot 10^7$ n=3 vs. SW,HCT, HEK/MTMR7: $1,246 \cdot 10^7 \pm 0,0646937 \cdot 10^7$ n=3; p= 0.0265).

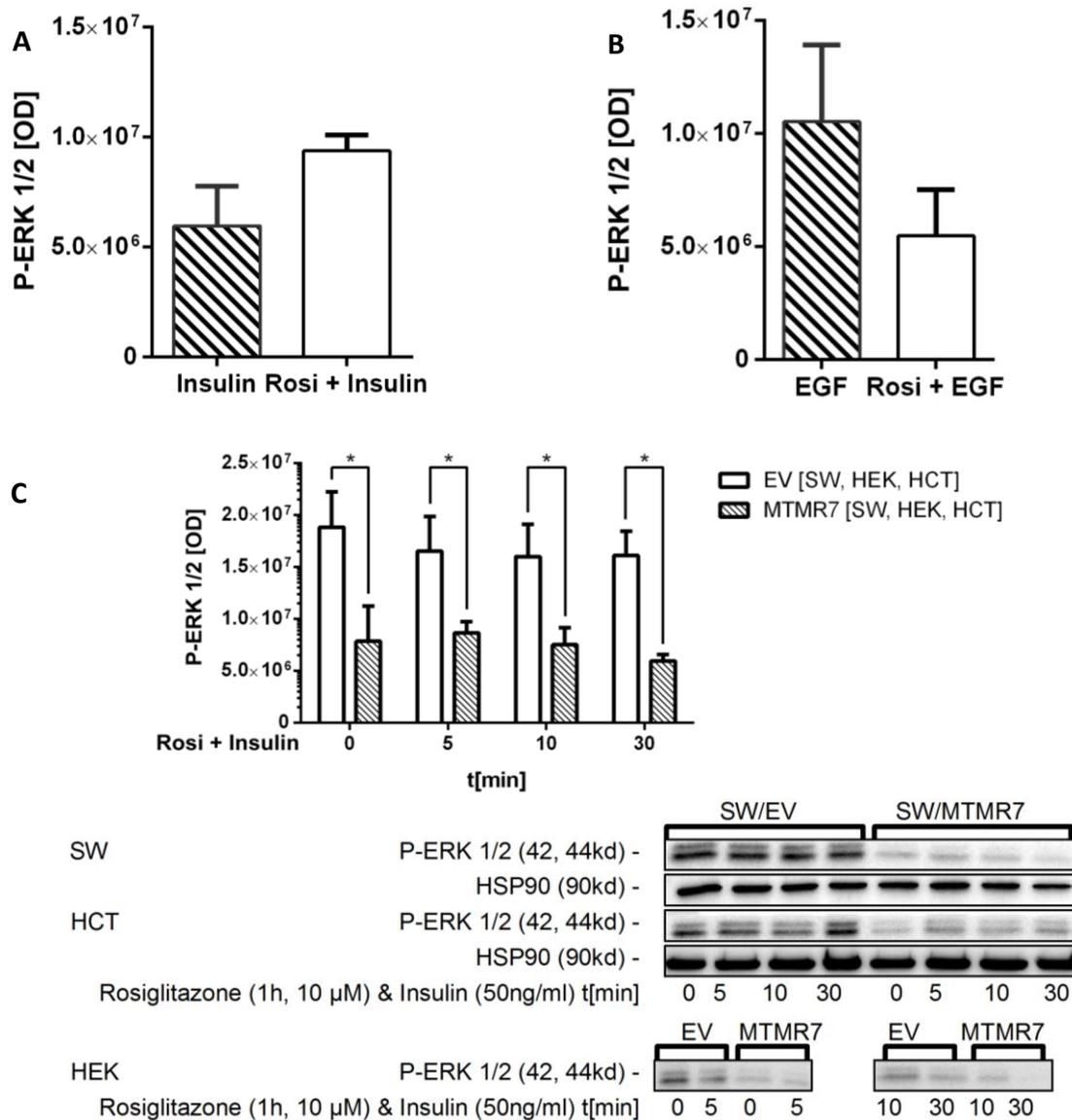


Abbildung 18. Präinkubation mit Rosiglitazone verstärkt die MTMR7-Vermittelte Hemmung der ERK 1/2 Phosphorylierung nach Insulinstimulation. Dargestellt sind repräsentative Western-Blots, Quantifizierung und statistische Auswertung MTMR7-überexprimierender Zellen und den entsprechenden Kontrollen. A: Die Präinkubation mit Rosiglitazone hat einen Trend zu einer Größeren Verminderung der MTMR7-Vermittelten ERK-1/2 Phosphorylierung nach Insulinstimulation zur Folge (Differenzen OD P-ERK1/2 nach Insulinstimulation [HCT116, HEK 293T, SW480] $5,969e+006 \pm 1,795e+006$ N=4 vs Differenzen OD P-ERK1/2 nach Rosiglitazone-Präinkubation und Insulin-Stimulation [HCT116, HEK 293T, SW480] $9,372e+006 \pm 722437$ N=4 $p=0,12$ zweiseitiger T-Test). B: Dieser Effekt lässt sich für die EGF-Stimulation nicht nachweisen (n=4). C: Die präinkubation mit Rosiglitazone vermindert die ERK1/2-Phosphorylierung nach Insulin-Stimulation zu jedem gemessenen Zeitpunkt ($t=0$: [HCT116, SW480 & HEK293T]/EV: $1,882175e+007$ vs : [HCT116, SW480 & HEK293T]/MTMR7: $7,836587e+006$ $p=0,004$, $t=5$: [HCT116, SW480 & HEK293T]/EV $1,650933e+007$ vs [HCT116, SW480 & HEK293T]/MTMR7 $8,633041e+006$ $p=0,03$., $t=10$: [HCT116, SW480 & HEK293T]/EV $1,599065e+007$ vs: [HCT116, SW480 & HEK293T]/MTMR7: $7,519425e+006$ $p=0,02$ $t=30$: [HCT116, SW480 & HEK293T]/EV $1,609541e+007$ vs. [HCT116, SW480 & HEK293T]/MTMR7 $5,941017e+006$, $p=0,07$, je $n=3$)

3.2.6 Die Effektstärke der MTMR7-Transfektion unterscheidet sich zwischen den beiden kolorektalen Karzinomzelllinien.

Es zeigte sich, dass die Effektstärke der MTMR7-Transfektion - ausgedrückt durch die Differenz der OD-Werte der jeweiligen RTK-Stimulationszeitpunkte MTMR7-transfizierter und Leervektor-transfizierter Zellen - in SW480-Zellen ohne PI3CA-Mutation größer war als in HCT116-Zellen. Dies gilt insbesondere für die Stimulation der untersuchten Signalwege durch Insulin. Hier findet sich eine signifikant größere Effektstärke für die S6-Phosphorylierung genauso wie ein größerer Effekt auf die ERK1/2-Signaltransduktion.

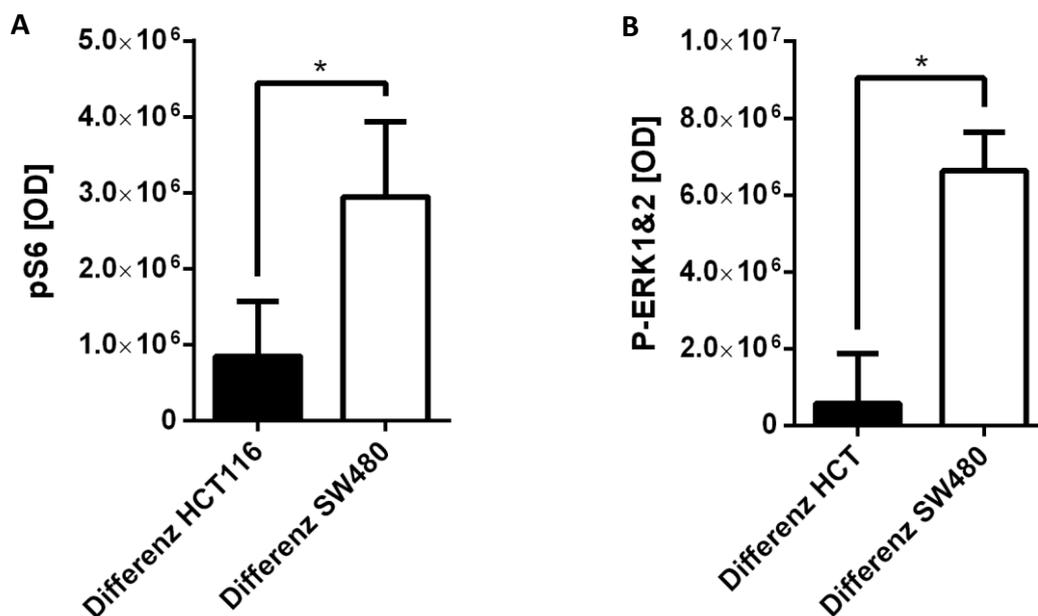


Abbildung 19. Die Effektstärke der MTMR7-Transfektion ist in SW480-Zellen signifikant größer als in der Zelllinie HCT116. Dargestellt ist der Vergleich der durchschnittlichen Differenz des S6- (A) und ERK1/2-Phosphorylierungsniveaus (B) zwischen MTMR7-überexprimierenden Zellen und entsprechenden Kontrollen von HCT116-Zellen mit derjenigen der Zelllinie SW480. Es zeigte sich eine signifikant größere Reduktion der Aktivität des PI3K (HCT116: $3,804 \times 10^6 \pm 4,509 \times 10^6$ N=3 vs. SW480 $18,90 \times 10^6 \pm 1,727 \times 10^6$ N=3, $p=0,0353$; zweiseitiger T-Test) und MAPK-Signalwegs (HCT116: $0,576792 \times 10^6 \pm 1,289 \times 10^6$ N=5 vs. SW480 $6,632 \times 10^6 \pm 1,002 \times 10^6$ N=5 $p=0,0060$; zweiseitiger T-Test) in SW480-Zellen, als in HCT116-Zellen

Dieser Unterschied zeigte sich für die Stimulation mit EGF nur für die AKT S473-Phosphorylierung (HCT116: $0,849596 \times 10^6$ SEM: $0,727735 \times 10^6$ vs SW480: $2,952 \times 10^6$ SEM $0,986895 \times 10^6$ $p=0,0264$, n=3, paired, two-tailed), nicht jedoch für die S6-Aktivierung. Eine Aussage für die ERK1/2-Aktivierung nach EGF-Stimulation lässt sich anhand der wenigen vorliegenden Daten nicht treffen.

3.2.7 MTMR7 hemmt die „nicht-genomische“ PPAR γ -Liganden-vermittelte Aktivierung von ERK

Wie beschrieben üben die insulinsensitivierenden PPAR γ -Agonisten der Gruppe der Thiazolidinedione wie Rosiglitazone oder Pioglitazone pro-proliferative, teils sogar prokarzinogene Effekte aus, die mit dazu beigetragen haben, ihre Bedeutung als Standardtherapeutika in der Therapie des Typ 2 Diabetes gravierend einzuschränken[68]. Rosiglitazone in einer Dosis $\geq 10\mu\text{M}$ führt dabei nicht nur zu einer Stimulation der transkriptionellen Aktivität des Kernrezeptors PPAR γ , sondern aktiviert gleichzeitig nach extrem kurzer Expositionsdauer die ERK1/2-Signalkaskade.[172] Mögliche Mechanismen hinter einer solchen „nicht-genomischen“ Aktivität der Kernrezeptorliganden stellen sowohl die Aktivierung alternativer Rezeptoren (beispielsweise des EGFR oder GPR40-Proteins) [173,174], alternative Effektoren, die beispielsweise eine ROS-Produktion in den Mitochondrien bedingen[8], oder zytosolische PPAR γ -Komplexe, wie der hier charakterisierte, dar.

Um den Einfluss von MTMR7 auf diese „nicht-genomischen“ Thiazolidinedion-Effekte zu analysieren, wurden MTMR7-transfizierte Zellen mit $10\mu\text{M}$ Rosiglitazone stimuliert und der (p42/p44)-ERK1/2-Phosphorylierungsstatus durch Western-Blot-Analyse bestimmt. Während sich keine basale ERK1/2 Phosphorylierung in HEK293T-Zellen zeigte, fand sich in den beiden kolorektalen, KRAS-mutierten Zelllinien HCT116 und SW480 ein basales Phospho-ERK1/2-Niveau bereits ohne Stimulation. Eine weitere, Rosiglitazone-vermittelte ERK-Aktivierung konnte jedoch durch MTMR7-Überexpression unterdrückt werden. Dies lässt sich in dem signifikant niedrigeren Phospho-ERK1/2-Niveau der HCT116-Zellen (HCT/EV: $2,376 \cdot 10^7 \pm 0,3790 \cdot 10^7$ N=4 vs HCT/MTMR7: $1,266e+007 \pm 0,064 \cdot 10^7$ N=4) genauso erkennen wie in den zusammengefassten O.D.-Werten der beiden kolorektalen Karzinomzelllinien. Hier zeigte sich ein signifikant niedrigeres ERK-Phosphorylierungsniveau nach 10 und 30 Minuten Rosiglitazone-Stimulation.

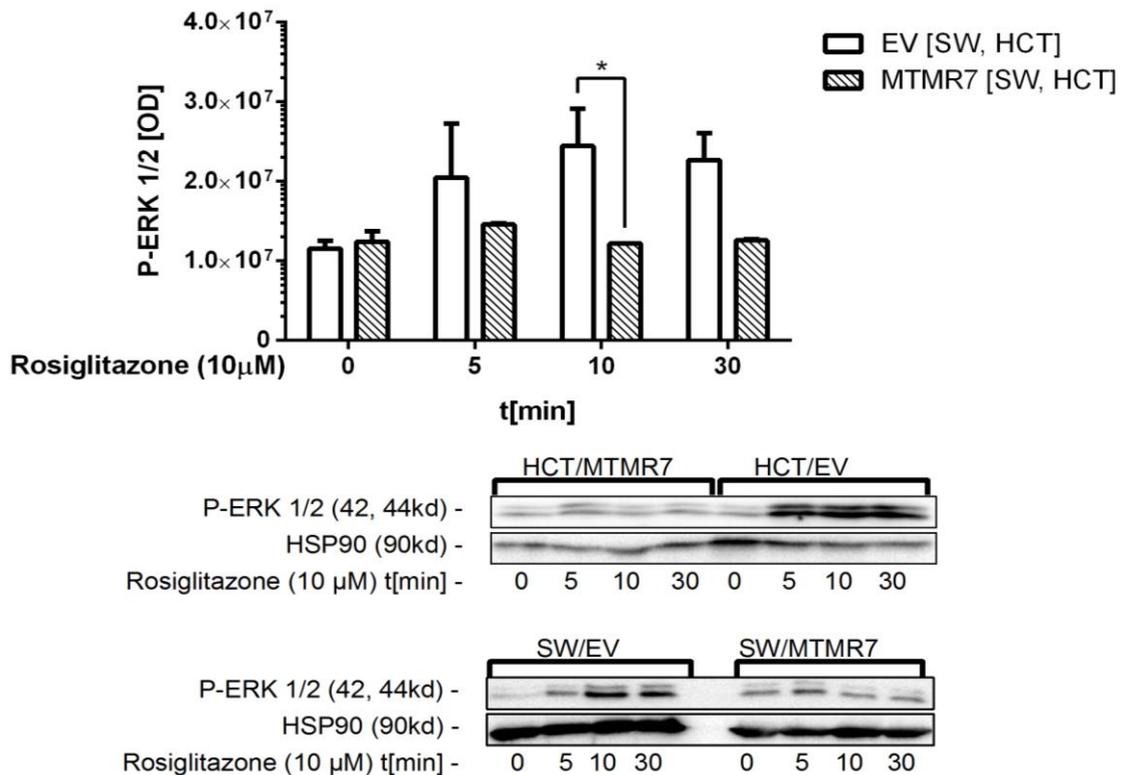


Abbildung 20. **MTMR7 hemmt die Rosiglitazone vermittelte ERK1/2 Aktivierung.** Dargestellt sind repräsentative Western-Blots mit Anti-Phospho-ERK1/2-Antikörper und HSP90-Abgleich mit Quantifizierung. Deutlich wird zum einen die Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch Rosiglitazone und zum anderen, dass diese durch MTMR7-Überexpression in den beiden kolorektalen Zelllinien signifikant reduziert wird ($t=10\text{min}$: $HCT\&SW/EV: 2,445 \cdot 10^7 \pm 0,4701 \cdot 10^6$ $n=2$ vs. $HCT\&SW/MTMR7: 1,219 \cdot 10^7 \pm 0,0027485 \cdot 10^7$ $n=2$ $p=0.0263093$; $t=30\text{min}$: $HCT\&SW/EV: 2,268 \cdot 10^7 \pm 0,3419 \cdot 10^7$ $n=2$ vs. $HCT\&SW/MTMR7: 1,258 \cdot 10^7 \pm 0,0094700 \cdot 10^7$ $n=2$ $p=0.0554714$; zweiseitiger T-Test).

Es zeigte sich in keiner der analysierten Zelllinien eine vermehrte oder durch MTMR7-beinflussbare Phosphorylierung der PI3K-Kaskade vermittelten AKT(THR308)-Phosphorylierung. In den beiden Darmkrebszelllinien fand sich jedoch eine leichte Zunahme der SER473-Phosphorylierung, die durch MTMR7-Überexpression verhindert werden konnte.

3.2.8 MTMR7-Überexpression führt zu einem Anstieg des zellulären HSP90-Gehalts in HEK293T-Zellen, jedoch nicht in den beiden kolorektalen Karzinomzelllinien.

Aktuelle Arbeiten anderer Arbeitsgruppen konnten eine wechselseitige Beeinflussung des Aktivitätsniveaus des Heat-Shock-Proteins-90 und des mTORC nachweisen[175]. Außerdem zeigte sich eine positive Korrelation zwischen HSP90-Expressionsniveau, PPRE-Aktivität und PPAR γ -assoziiertem Phänotyp, sowohl in HEK293-Zellen als auch in vivo[104]. Wie oben gezeigt, fungiert MTMR7 nicht nur als Inhibitor des mTOR-Signalwegs, sondern unterbricht gleichzeitig die Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade. Es hemmt also Signalwege, die sowohl für die Regulation der HSP90-Funktion als auch für die der PPRE-Aktivität von zentraler Bedeutung sind.

Bereits ohne weitere Beeinflussung der Zelle führte MTMR7-Überexpression in HEK293T-Zellen zu einem leichten, aber signifikanten Anstieg des HSP90-Gehalts auf Proteinebene (HEK293T/EV: $1,489 \cdot 10^7 \pm 0,1649 \cdot 10^7$ n=18 vs. HEK293T/MTMR7: $1,846 \cdot 10^7 \pm 0,1164 \cdot 10^7$ n=18; p= 0.0464 ; gepaart, zweiseitiger T-Test). Dieser Effekt konnte weder für HCT116-Zellen noch für die Zelllinie SW480 nachgewiesen werden. (SW480/EV: $0,8859 \cdot 10^7 \pm 0,0705827 \cdot 10^7$ n=35 vs. SW480/MTMR7: $1,090 \cdot 10^7 \pm 0,1056 \cdot 10^7$ n=34; p=0.0752 paired, two-tailed; HCT116/EV: $1,266 \cdot 10^7 \pm 0,1137 \cdot 10^7$ n=34 vs. HCT116/MTMR7: $1,114 \cdot 10^7 \pm 0,00844004 \cdot 10^7$ n=34; p= 0.0752 ; gepaart, zweiseitiger T-Test) (FIG31&32).

3.2.9 MTMR7 hemmt den PPAR γ -Agonist-vermittelten Anstieg des zellulären HSP90-Gehalts

In allen 3 Zelllinien führte eine einstündige Behandlung mit 10 μ M Rosiglitazone zu einem rapiden Anstieg des HSP90-Niveaus auf Proteinebene.

Dieser Anstieg war in den beiden kolorektalen Karzinomzelllinien (HCT/EV: $1,266 \cdot 10^7 \pm 0,1137 \cdot 10^7$ n=34 vs. HCT/EV + Rosi: $2,700 \cdot 10^7 \pm 0,4780 \cdot 10^7$ n=8 p<0.0001; SW/EV: $0,8859 \cdot 10^7 \pm 0,0705827 \cdot 10^7$ n=35 vs. SW/EV + Rosi: $1,372 \cdot 10^7 \pm 0,0518407 \cdot 10^7$ n=8 p= 0.0025 ; Zweifacher ANOVA) signifikant und auch in HEK293T-Zellen nachweisbar, wenngleich nicht auf signifikantem Niveau (HEK/EV: $1,489 \cdot 10^7 \pm 0,1649 \cdot 10^7$ n=18 vs. HEK/EV + Rosi: $1,981 \cdot 10^7 \pm 0,1201 \cdot 10^7$ n=8 p=0,0726; zweiseitiger T-Test).

Überexpression von MTMR7 führte in allen drei Zelllinien zu einer signifikanten Reduktion dieses Effekts (SW/EV: " $0,8859 \cdot 10^7 \pm 0,0705827 \cdot 10^7$ n=35" vs. SW/MTMR7 + Rosi: " $0,8111 \cdot 10^7 \pm 0,1338 \cdot 10^7$ n=8" p=0.6449; HEK/EV: " $1,489 \cdot 10^7 \pm 0,1649 \cdot 10^7$ n=18" vs. HEK/MTMR7 + Rosi: " $1,376 \cdot 10^7 \pm 0,0798054 \cdot 10^7$ n=8" p= 0.6609 ; HCT/EV: " $1,266 \cdot 10^7 \pm 0,1137 \cdot 10^7$ n=34" vs. HCT/MTMR7 + Rosi: " $1,842 \cdot 10^7 \pm 0,1309 \cdot 10^7$ n=8" p=0.0234; Zweifacher ANOVA).

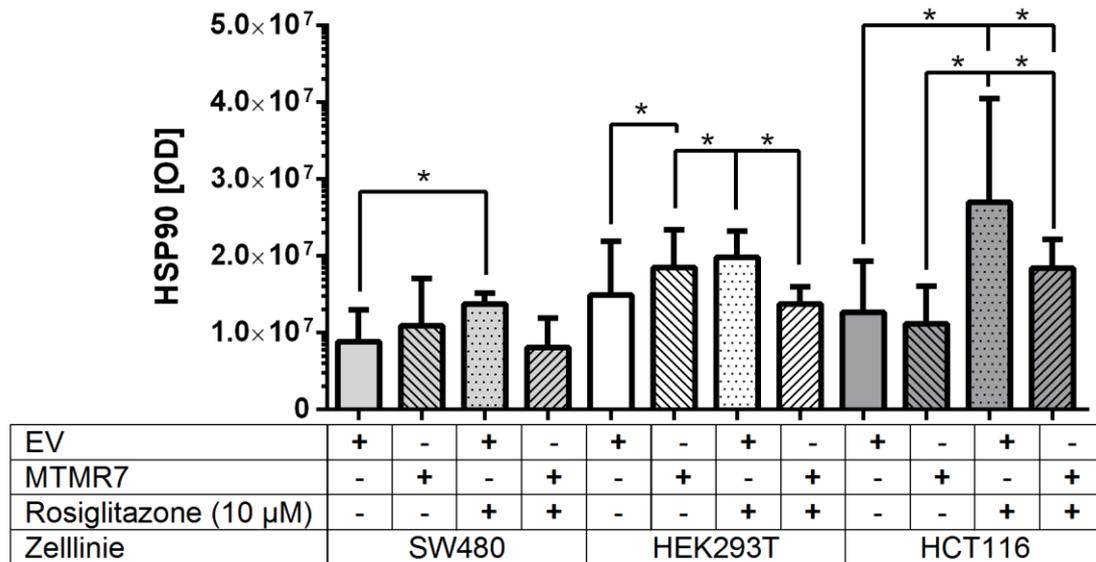


Abbildung 21. **MTMR7-Überexpression und Rosiglitazonebehandlung verändern das HSP90 Proteinexpressionsniveau in HEK293T- und den beiden kolorektalen Zelllinien.** Dargestellt ist die Quantifizierung sämtlicher Blots, in denen HSP90 als Abgleich verwendet wurde. Deutlich wird die Änderung des HSP90-Gehalts durch MTMR7-Überexpression. Dies war der Grund, weshalb die weitere statistische Auswertung nicht mehr mit für HSP90 normalisierten OD-Werten durchgeführt wurde. Zudem führte eine sechzigminütige Präinkubation der Zellen mit Rosiglitazone zu einem signifikanten Anstieg des HSP90-Proteingehalts. Dieser Effekt wurde durch MTMR7-Überexpression in HEK293T- und HCT116-Zellen signifikant reduziert. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus $n \geq 3$ Experimenten.

3.3 MTMR7 reduziert das Zellwachstum kolorektaler Karzinomzelllinien mit Mutationen des Ras- und WNT-Signalwegs

Myotubularine gelten nicht zuletzt aufgrund ihres Effekts auf die AKT-Signaltransduktion als „survival phosphatases“ [147,176]. Gleichzeitig scheint MTMR7 in diesem Kontext eine Sonderrolle einzunehmen, hat es doch keine fördernde Wirkung auf die AKT-Funktion, sondern eine hemmende.

Um den Einfluss des MTMR7-Proteins auf die Proliferation kolorektaler Karzinomzelllinien zu untersuchen, wurden Zellen, die entweder transient oder konstant MTMR7 überexprimierten, mit entsprechenden Kontrollen für mehrere Tage entweder in Standardmedium oder in Standardmedium mit einem Zusatz von 10 µM Rosiglitazone oder 50 ng/ml Insulin inkubiert. Das Experiment wurde mit Hilfe eines kolorimetrischen MTT-Tests analysiert.

MTMR7-Überexpression führte sowohl in konstant MTMR7-überexprimierenden HCT116- als auch in entsprechenden SW480-Zellen zu einer signifikant verminderten Wachstumsrate bereits in Abwesenheit zusätzlicher Wachstumsstimuli, verglichen mit den entsprechenden Kontrollgruppen. Die Zunahme war in SW480-Zellen mit MTMR7-Überexpression etwa 32% niedriger als in der Kontrollgruppe [171]. In HCT116-Zellen fiel der Effekt mit einer um 19 Prozent verminderten Zellzahl etwas geringer aus, war jedoch immer noch signifikant [171].

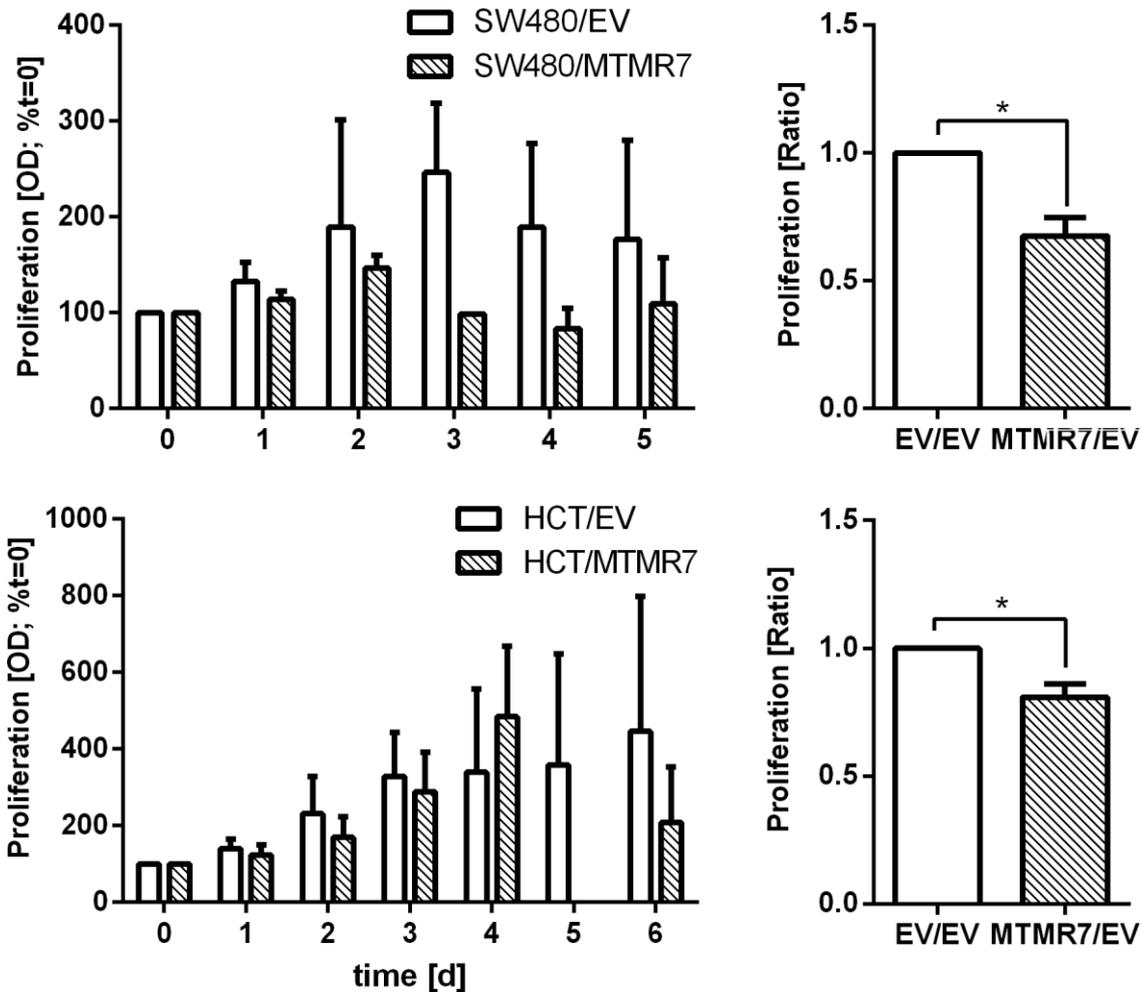


Abbildung 22. **MTMR7-Überexpression führt zu einer signifikanten Verminderung der Proliferationsrate der beiden kolorektalen Zelllinien.** Dargestellt ist die Quantifizierung von MTT-Assay-gestützten Wachstumsanalysen der beiden kolorektalen Karzinomzelllinien SW480 (oben) und HCT116 (unten) für die einzelnen Tage des Experiments sowie als Zusammenfassung aller Zeitpunkte. Sowohl für die SW480- (*Durchschnitt der Differenz (MTMR7/EV-EV/EV): -0,3251, SEM der Differenzen 0,07120 p= 0,0103; gepaart, zweiseitiger T-Test*), als auch für HCT116-Zellen (*Durchschnitt der Differenz (MTMR7/EV-EV/EV): -0,1909, SEM der Differenzen 0,05094, p= 0,0332; zweiseitiger T-Test*) fand sich nach Normalisierung auf die Leervektor-exprimierenden Kontrollen ein signifikant verminderte Wachstumsrate.

Dieser Effekt ließ sich nach transienter Transfektion nicht nachweisen.

3.3.1 MTMR7 mindert das Zellwachstum unter hyperinsulinämischen Bedingungen

Um den Einfluss des MTMR7-Proteins auf das Insulin-vermittelte Zellwachstum in vitro zu untersuchen, wurden MTMR7-überexprimierende Zellen und entsprechende Kontrollen für mehrere Tage unter hyperinsulinämischen Bedingungen gehalten. Zur Simulation der Hyperinsulinämie ist die Anhebung des Insulingehalts im Standardmedium in Experimenten mit SW480- und HCT116-Zellen um 20[177] – 100ng [178,179] beschrieben, wir nutzten eine

Anhebung

um

50ng/ml.

Unter diesen Bedingungen führte die stabile MTMR7-Überexpression zu einem deutlich niedrigeren Proliferationsniveau in HCT116-Zellen insbesondere gegen Ende des Behandlungszeitraums.

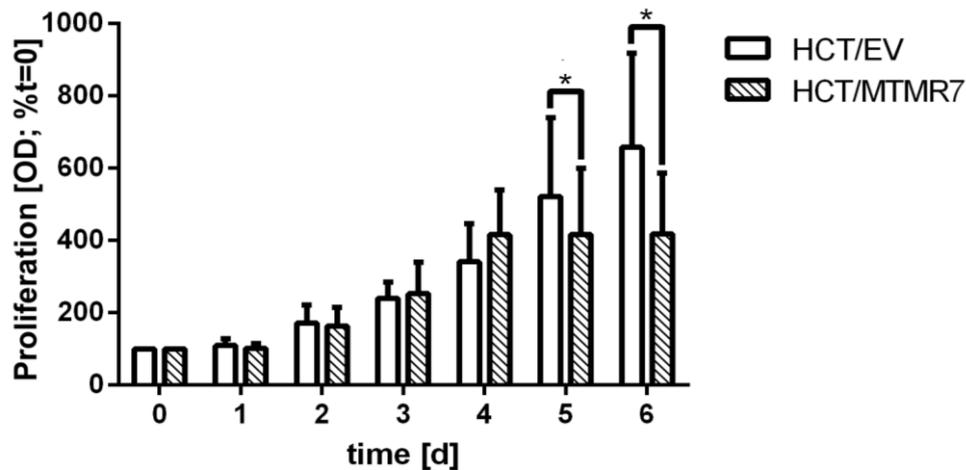


Abbildung 23. **MTMR7-Überexpression führt zu einer Verminderung des Zellwachstums unter hyperinsulinämischen Bedingungen.** Dargestellt ist die Quantifizierung der MTT-Assay-gestützten Wachstumsanalyse der Zelllinie HCT116, die in Standardmedium mit einem um 50 ng/ml erhöhtem Insulingehalt kultiviert wurden. Am fünften und sechsten Tag der Behandlung fand sich ein signifikant vermindertes Zellwachstum in Zellen mit MTMR7-Überexpression ($t=5d$, $HCT116/EV$: $521,9\% \pm 76,85\%$ $n=8$ vs. $HCT116/MTMR7$: $417,3\% \pm 60,86\%$ $n=9$, $p=0.0450219$; $t=6d$, $HCT116/EV$: $657,7\% \pm 116,7\%$ $n=5$ vs. $HCT116/MTMR7$: $419,1\% \pm 83,41\%$ $n=4$, $p=0.0010$; zweiseitiger T-Test).

Derselbe Trend zeigte sich in SW480-Zellen: Eine deutlich niedrigere Zelldichte konnte zu allen Messzeitpunkten nachgewiesen werden, insgesamt war die Proliferationsrate durch die MTMR7-Überexpression um durchschnittlich 18% gegenüber der Kontrollgruppe reduziert.

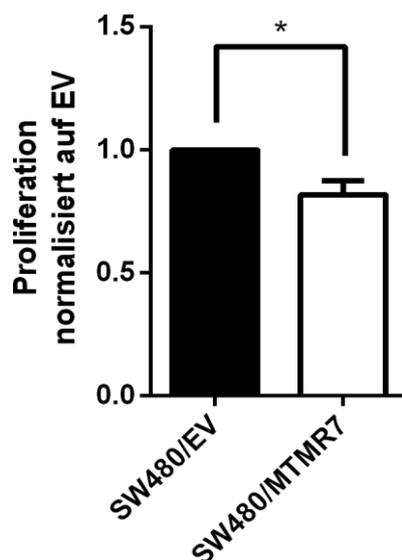


Abbildung 24. Die MTMR7-Überexpression führt zu einer Verminderung des Zellwachstums unter hyperinsulinämischen Bedingungen. Dargestellt ist die Quantifizierung der MTT-Assay-gestützten Wachstumsanalyse der Zelllinie SW480, die in Standardmedium mit einem um 50 ng/ml erhöhtem Insulingehalt kultiviert wurden, normalisiert wurde auf die jeweiligen Werte mit Leervektor transfizierter Zellen. (Durchschnitt der Differenzen: (MTMR7/EV-EV/EV): -0,1822 , SEM der Differenzen 0,05594; $p=0.0472$ 4 Paare, gepaarter, zweiseitiger T-Test).

In transient transfizierten HCT116-Zellen fiel der inhibitorische Effekt auf das Zellwachstum ebenfalls deutlich aus. Es fand sich eine über alle Messpunkte hinweg um durchschnittlich 71% reduzierte Proliferationsrate (Durchschnitt der Differenz (MTMR7-EV): -71,43, SEM der Differenzen 21,28, $p=0,0284$ $n=5$; gepaart, zweiseitiger T-Test) (FIG). In transient transfizierten HEK293T- und SW480-Zellen zeigte sich kein signifikanter Effekt oder Trend.

3.3.2 MTMR7 mindert das Zellwachstum in transient transfizierten HCT116-Zellen unter Einwirkung von Rosiglitazone

Um den Einfluss sowohl der „nicht-genomischen“ als auch der genomischen Effekte von Rosiglitazone auf das Zellwachstum kolorektaler Tumorzelllinien in Zusammenhang mit einem veränderten MTMR7-Status zu untersuchen, wurden transient und stabil MTMR7-überexprimierende Zellen und entsprechende Kontrollen für mehrere Tage mit 10 μM Rosiglitazone behandelt. In transient transfizierten HCT116-Zellen zeigte sich bei der Analyse über alle Zeitpunkte hinweg ein etwa 50% reduziertes Zellwachstum (Durchschnitt der Differenz (MTMR7-EV): -49,88, SEM der Differenzen 20,18, $p=0,0330$ gepaart, zweiseitiger T-Test; $n=11$, 3 unabhängige Wiederholungen). Gleiches ließ sich bei der Analyse der einzelnen Expositionsdauern für Tag 3 feststellen (Mittlere Differenz HCT116/EV - HCT116/MTMR7: $111,7 \pm 38,84$ $N=3$, $p < 0,05$, zweiseitiger T-Test). Dieser Effekt war weder für die anderen Zelllinien noch für stabil transfizierte Zellen reproduzierbar.

3.4 MTMR7 beeinflusst die Chemosensitivität MSI- und MSS-kolorektaler Karzinomzelllinien

Fehlendes Ansprechen auf oder Entwicklung einer Resistenz gegenüber Chemotherapeutika ist ein Hauptproblem in der Therapie des fortgeschrittenen kolorektalen Karzinoms[180,181], so dass die Evaluation von Markern, die ein adäquates Ansprechen vorhersagen und somit die Auswahl und Einleitung einer potentiell nebenwirkungsreichen Therapie rechtfertigen können, intensiv beforscht wird. Wie einleitend diskutiert, stellt Mikrosatelliteninstabilität einen potentiellen Marker für Therapieansprechen auf 5-Fluoruracil(5FU) enthaltende Chemotherapie-Regime dar[15] und ist in diesem Rahmen aktuell Gegenstand großer, prospektiver Studien [182]

Um den Einfluss von MTMR7 auf die Chemosensitivität im kolorektalen Karzinom analysieren zu können, wurden die Überlebensraten stabil MTMR7 oder einen Leervektor exprimierender MSI+ (HCT116) und MSS-Zellen (SW480) unter Therapie mit Cisplatin und 5FU analysiert. Durch Ergänzung der Chemotherapeutika um den mTOR-Inhibitor Everolimus oder den PPAR γ -Agonisten Rosiglitazone sollten der Einfluss der MTMR7-Überexpression auf das mTORC-Signaling und die Möglichkeit einer gezielten pharmakologischen Manipulation der Phosphatase untersucht werden.

Die Zelllinien wurden kultiviert und behandelt, wie oben erläutert.

Bereits von Bracht et al. konnte gezeigt werden, dass die MSI+ Zelllinie HCT116 signifikant sensibler auf eine Exposition mit dem Chemotherapeutikum 5FU reagiert, als Zellen der MSS Linie SW480. [183]. Diese Beobachtung ließ sich in den hier durchgeführten Experimenten reproduzieren (s. Abbildung 25 1&2).

Zudem wurde die Gabe von 5-FU und Cisplatin um Rosiglitazone und den mTOR-Inhibitor Everolimus ergänzt. Hierzu wurde zunächst ein Toxizitätsassay durchgeführt, um die am stärksten wirksame Everolimusdosis unter Therapie mit dem jeweiligen Chemotherapeutikum zu ermitteln. Der größte, wenn auch nicht signifikante Effekt auf die Zelllinie HCT116 unter 5FU-Exposition zeigte sich hier bei einer Everolimuskonzentration von 1 nM, die für die weiteren Experimente verwendet wurde. Vorbeschrieben ist insbesondere für die Zelllinie HCT116, dass bedingt durch die PI3KCA- und RAS-Mutationen der antiproliferative Effekt des mTORC-Inhibitors Everolimus umgangen wird, was durch Aktivierung alternativer Signalkaskaden zu einem vermehrten Zellwachstum unter Gabe von Everolimus führt[184]. Die Überexpression von MTMR7 scheint diesem Effekt entgegen zu wirken. Wie in Abbildung 25 erkennbar, führt die Exposition mit Everolimus zu einer erhöhten Überlebensrate (3). Eine konstante MTMR7-Überexpression hebt diesen Effekt auf, die entsprechend transfizierten Zellen verhalten sich wie Zellen ohne zusätzliche Everolimusgabe. Unter gleichzeitiger Therapie mit Cisplatin fällt dieser Effekt noch deutlicher aus (s. Abbildung 27).

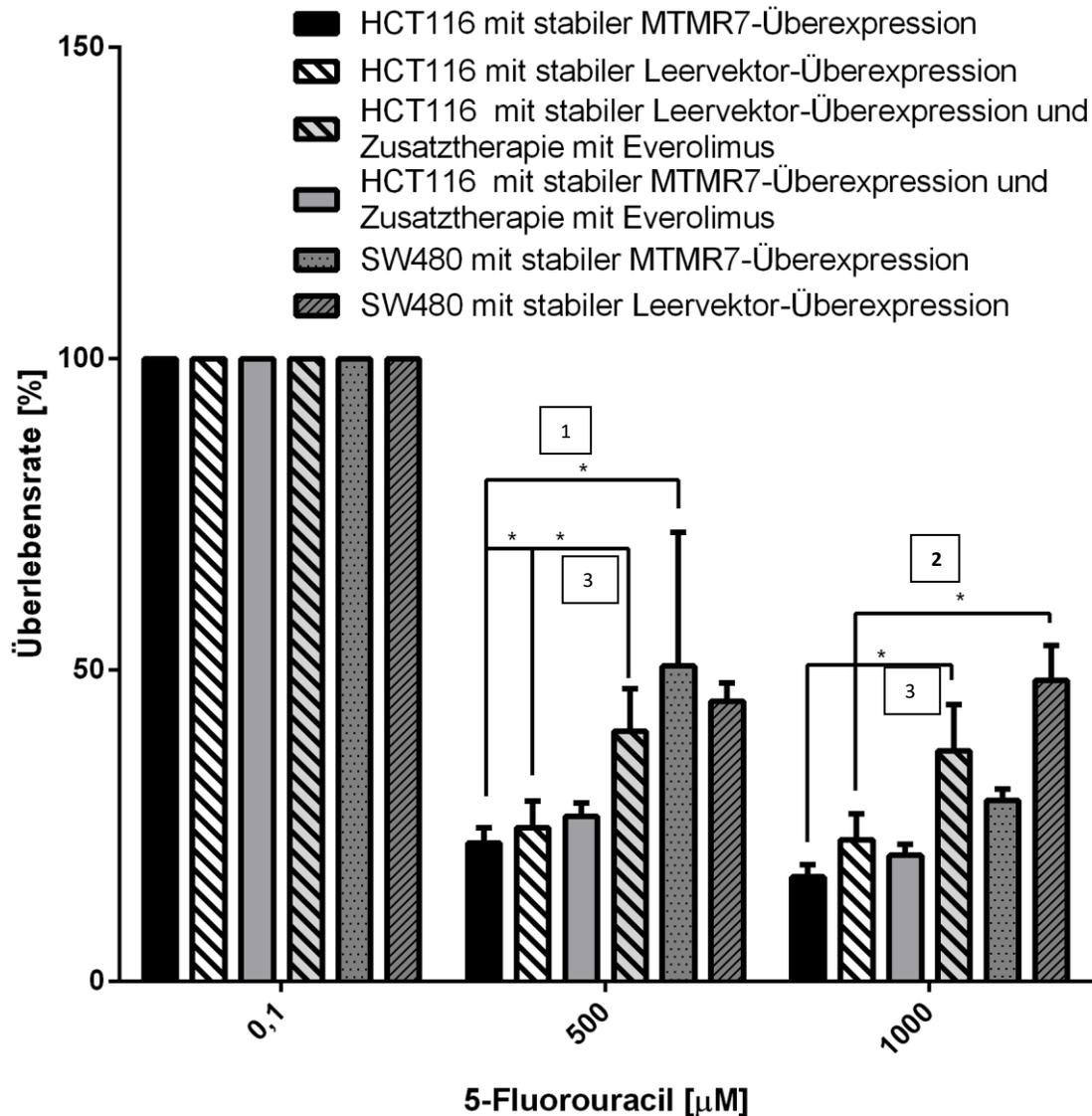


Abbildung 25. MTMR7 hemmt die durch RAS und PI3KCA vermittelte Resistenz gegenüber dem mTORC-Inhibitor Everolimus in der Karzinomzelllinie HCT116. Dargestellt ist die Rate vitaler mit verschiedenen Konzentrationen des Chemotherapeutikums 5FU(x-Achse) und 1nM Everolimus behandelter Zellen bezogen auf eine niedrige 5FU-Konzentration von 0,1 µM. Erkennbar ist die erhöhte Sensibilität der MSI+ Zelllinie HCT116 gegenüber dem Chemotherapeutikum 5FU, verglichen mit der MSS-Zelllinie SW480 (1&2) (500 µM: Differenz HCT116/MTMR7 (n=8) vs. SW480/MTMR7 (n=2): -28,48 % ± 7,659% p < 0,05 Mehrfaktorielle ANOVA; 1000 µM: Differenz HCT116/EV (n=9) vs SW480/EV (n=2): -25,56 % ± 7,573 % p < 0,05 mehrfaktorielle ANOVA). Gleichzeitig wird deutlich, dass die mit der mTORC1-Inhibition assoziierte verminderte Sterberate durch MTMR7-Überexpression auf das Niveau der Zellen ohne Everolimus-Exposition gesenkt wird (3) (500 µM: Differenz HCT116/MTMR7 (n=8) vs HCT116/EV + Everolimus (n=6): -17,99 % ± 5,232 % p < 0,05, HCT116/EV (n=9) vs HCT116/EV + Everolimus (n=6): -15,50 % ± 5,106%; 1000 µM: Differenz HCT116/MTMR7 (n=8) vs HCT116/EV + Everolimus (n=6): -20,28 & ± 5,232% p < 0,05 beide mehrfaktorielle ANOVA).

Zusätzlich wurde versucht die Chemosensibilität der Zelllinien durch eine zusätzliche Behandlung mit Rosiglitazone zu steigern. Tatsächlich fand sich eine gesteigerte Sensibilität

gegenüber niedrigen 5FU Dosen nach Koinkubation mit 10 μM Rosiglitazone, unabhängig allerdings vom Grad der MTMR7-Expression.

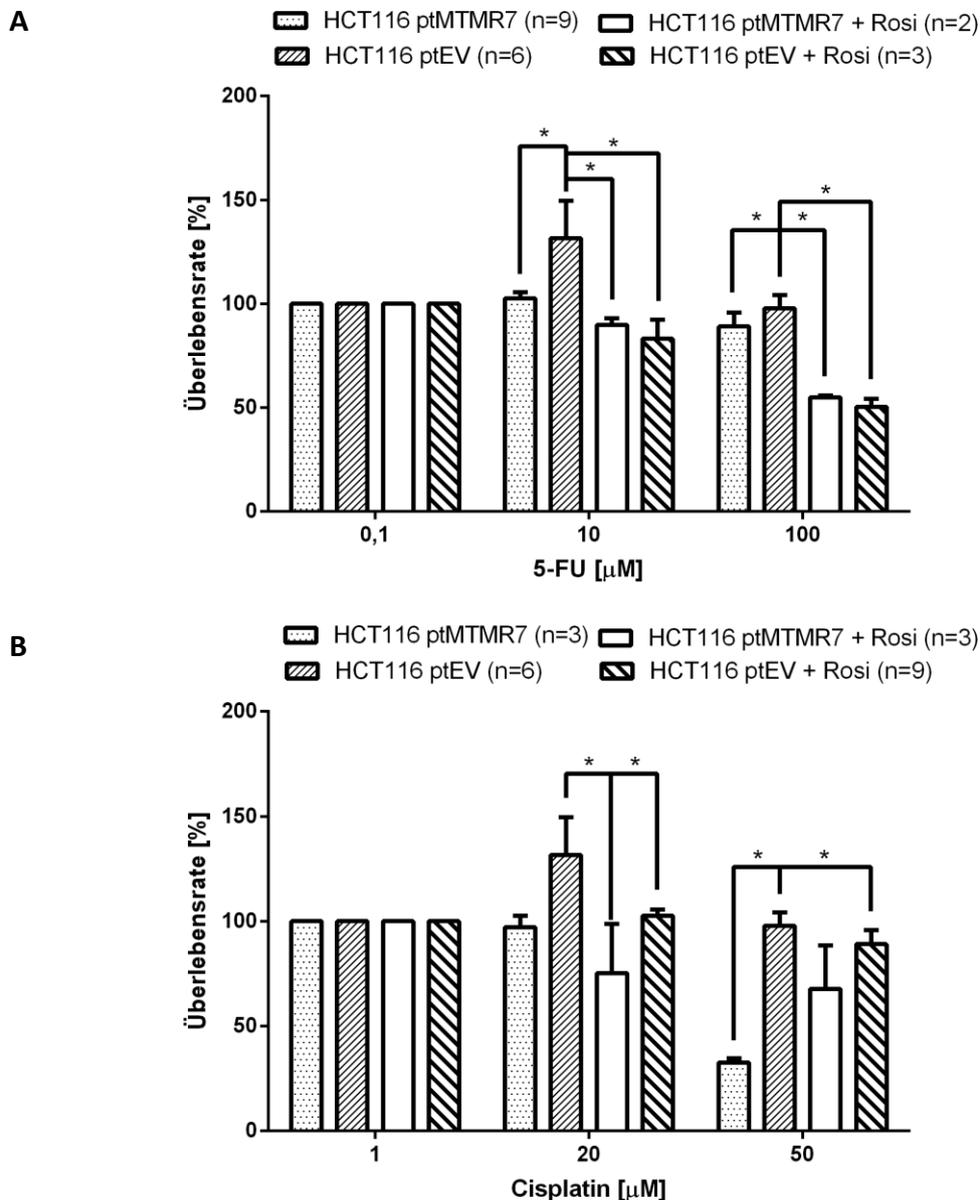


Abbildung 26. : **Die zusätzliche Behandlung mit Rosiglitazone führt zu einer Verstärkung des chemotherapeutischen Effekts unabhängig vom MTMR7-Status.** A: Dargestellt ist die Überlebensrate bezogen auf mit 0,1 μM 5FU behandelte Zellen der Linie HTC116 mit und ohne zusätzliche Gabe von Rosiglitazone. Deutlich wird der additive Effekt, was die Toxizität von 5FU angeht, der jedoch unabhängig von der MTMR7-Überexpression auftritt. B: Ein ähnliches Verhalten lässt sich für die Gabe von Cisplatin beobachten: sowohl die Transfektion mit MTMR7 als auch die zusätzliche Gabe von Rosiglitazone führen zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber dem Chemotherapeutikum. Der Effekt von Rosiglitazone ist MTMR7 unabhängig. (überall mehrfaktorielle ANOVA; *= $p < 0,05$)

Neben 5FU wurde auch die Sensibilität stabil MTMR7-überexprimierender Zellen gegenüber Cisplatin untersucht. Dabei zeigte sich in HCT116-Zellen unter Konzentrationen bis 20nM kein zytotoxischer Effekt, insbesondere in den Zellen ohne MTMR7-Überexpression, die ein leichtes Zellwachstum aufwiesen. Diese Proliferation blieb unter MTMR7-Überexpression aus, unter 20 nM fand sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. Insgesamt ließ sich in MTMR7-überexprimierenden HCT116-Zellen eine signifikant größere Sensibilität gegenüber der Cisplatinexposition nachweisen (Gesamtüberlebensrate: HCT116/MTMR7: $77,21 \pm 32,5$ n=6 vs. $89,30 \pm 35,62$ n=6 p=0,0290, zweiseitiger T-Test). Dieser Effekt ließ sich durch die Addition von 10 μ M Rosiglitazone noch steigern. 20 bis 100 nM Cisplatin führten unter Rosiglitazone zusammengefasst zu einer signifikant niedrigeren Zelldichte in MTMR7-überexprimierenden Zellen, verglichen mit nicht-Rosiglitazone-behandelten Zellen mit ektopem MTMR7 (Gesamtüberlebensrate: HCT116/MTMR7 + 10 μ M Rosiglitazone: $57,34\% \pm 24,84$ n=3 vs. HCT116/MTMR7 ohne 10 μ M Rosiglitazone $78,13\% \pm 31,44$ n=3 p=0,0345; zweiseitiger T-Test). Es fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Rosiglitazone-behandelten Zellen ohne MTMR7-Überexpression und MTMR7-transfizierten, nicht-Rosiglitazone-behandelten Zellen, was den Schluss nahelegt, die Toxizitätssteigerung durch Rosiglitazone sei MTMR7-abhängig. Da jedoch auch kein signifikanter Unterschied zwischen Rosiglitazone-behandelten Zellen mit und ohne ektopem MTMR7 nachgewiesen werden konnte, ist dieser Schluss unter Vorbehalt zu ziehen.

Die additive Gabe von Everolimus zeigte wie schon im Fall von 5-FU keinen zusätzlichen zytotoxischen Effekt. Gleichzeitig verschwand unter Gabe von 0,5 nM Everolimus der eingangs beschriebene Proliferationsunterschied unter 20nMCisplatin (s. Abbildung 27). Zellen ohne zusätzliches MTMR7 verhielten sich also unter mTOR-Inhibition genauso wie Zellen mit zusätzlichem MTMR7 ohne weitere Manipulation des mTORC-Signalwegs.

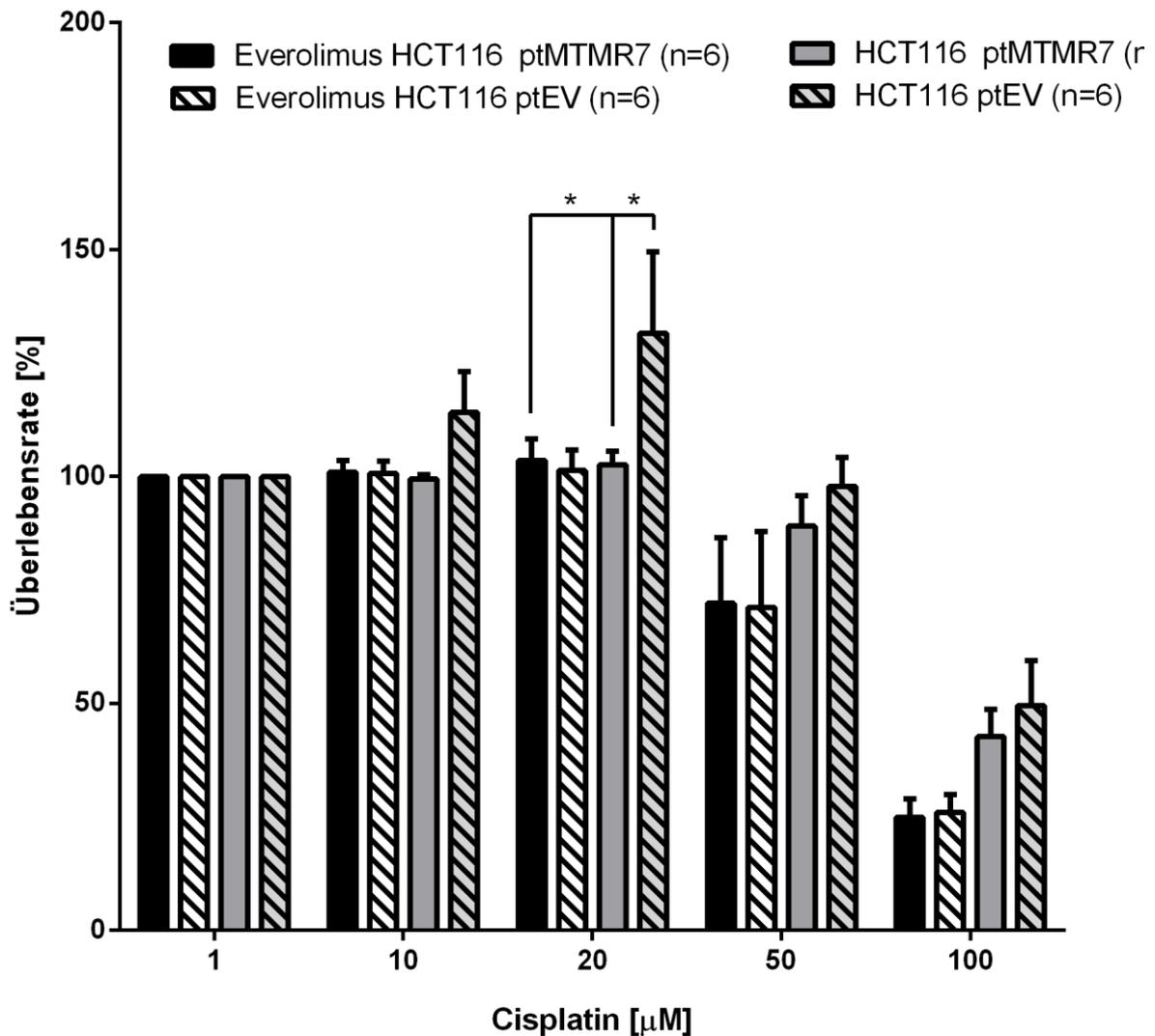


Abbildung 27. **MTMR7-Überexpression reduziert die Chemoresistenz der Zelllinie HCT 116 gegenüber Cisplatin und imitiert den Effekt einer Behandlung mit dem mTORC-Inhibitor Everolimus.** Dargestellt ist die Rate vitaler mit verschiedenen Konzentrationen des Chemotherapeutikums Cisplatin (x-Achse) und 0,5 nM Everolimus behandelter Zellen. Bei niedrigen Cisplatinkonzentrationen kommt es zu einem signifikanten Zellwachstum in den leervektortransfizierten Zellen. MTMR7-Überexpression oder der Zusatz von Everolimus hemmen diesen Effekt in gleicher Weise.

3.5 Analyse der MTMR7-Expression im humanen kolorektalen Karzinom

3.5.1 MTMR7-Verlust ist ein häufiges Ereignis im humanen kolorektalen Karzinom und korreliert mit der Dedifferenzierung der Tumore

Hinweise auf die Bedeutung des MTMR7-Proteins im humanen kolorektalen Karzinom sollten durch immunhistochemische Analyse der MTMR7-Proteinexpression in 110 Proben von kolorektalen Tumoren, Proben der unveränderten Mukosa von 8 gesunden Individuen und 9

Typ 2 Diabetikern, die gleichzeitig an einem kolorektalen Karzinom erkrankt waren, gewonnen werden.

Während MTMR7 in sämtlichen Proben benignen Darmepithels (n=17) nachgewiesen werden konnte, war es in 55% (60 von 110) der analysierten Tumorproben verlorengegangen. Betrachtet man nur die Proben mit unbekanntem Status bezüglich Typ 2 Diabetes mellitus (T2DM) oder *loss of imprinting* (LOI) des *insulin-like* Growthfactor (IGF)2-Gens, so ließ sich MTMR7 in 40% (26 von 65) der Karzinome nicht mehr nachweisen. Ein ähnliches Verhältnis fand sich in Patienten ohne T2DM und ohne IGF2 LOI. In dieser Gruppe war MTMR7 in 47% (7 von 15) der Fälle nicht mehr nachweisbar (Abbildung 28 A)[171].

Bemerkenswerterweise war der Verlust von MTMR7 assoziiert mit der zunehmenden Dedifferenzierung der Tumore. Nachweisbar in 72% (8 von 11) der G1 Läsionen ließ sich das Protein nur noch in 48% (33 von 69) der G2-Tumore und 33% (8 von 24) der G3-Karzinome anfärben. Dieser Effekt ließ sich sowohl in der dichotomen, qualitativen Analyse nachweisen als auch in der semiquantitativen Auswertung einer Subgruppe mit unbekanntem T2DM- oder IGF2-LOI-Status (FIG45)[171].

Zwischen MTMR7-Expression und anderen tumor- oder patientenspezifischen Charakteristika wie UICC-Stadium, TNM-Status, Tumorlokalisation, KRAS-Mutationsstatus, Höhe des CEA-Werts, LOH, Alter, Geschlecht oder *body-mass*-Index konnte keine Korrelation gefunden werden.

3.5.2 Die Identifikation zweier Risikogruppen für MTMR7-Verlust:

Die oben beschriebene funktionelle Verflechtung zwischen MTMR7 und der insulinvermittelten Aktivierung des PI3K-Signalwegs ließ Patientengruppen in den Fokus rücken, die eine Veränderung des Aktivitätsniveaus in eben dieser Signalkaskade aufwiesen. Die T2DM-assozierte Insulinresistenz zieht insbesondere in Frühstadien der Krankheit eine reaktive Hyperinsulinämie nach sich. Da sich die Resistenz gegenüber dem pro-proliferativen Hormon jedoch nur teils auf die zellwachstumsfördernde AKT-Aktivierung[130] auswirkt, stellen nicht-insulinabhängige Typ-2-Diabetiker (n=17) eine der beiden, in diesem Zusammenhang analysierten, Gruppen dar. Die andere Gruppe bilden Patienten, deren Tumore aufgrund LOIs eine vermehrte auto- und parakrine IGF2-Sekretion, die ebenfalls eine Überaktivität der PI3K-AKT-mTORC-Kaskade nach sich zieht (n=13), aufweisen. Es zeigte sich eine starke Korrelation zwischen MTMR7-Verlust und beiden Parametern: In 88% (15 von 17) der Proben von Patienten mit diabetischer Stoffwechsellage ließ sich kein MTMR7 mehr nachweisen, in der Gruppe mit LOI fand sich in keinem der Tumoren eine positive Färbereaktion gegenüber MTMR7[171].

Verglichen mit der Kontrollgruppe ohne T2DM und IGF2 LOI fand sich der stärkste Effekt in der letzteren Gruppe: LOI des IGF2-Gens war mit einem signifikant höheren Risiko für MTMR7-Verlust assoziiert (OR: 13,71, p=0,0157). Eine ähnlich starke Risikoerhöhung fand sich in der Gruppe der Diabetiker (OR 8,57, p=0,0209)[171]. Bemerkenswerterweise gilt dies nicht für die benigne Mucosa, in der sich auch in den Proben der Diabetiker noch eine deutliche MTMR7-Expression im Epithel nachweisen ließ. Die gleiche Aussage lässt sich für andere physiologischerweise MTMR7-exprimierende Gewebe wie die Muskularis der Schleimhaut oder Gefäße treffen.

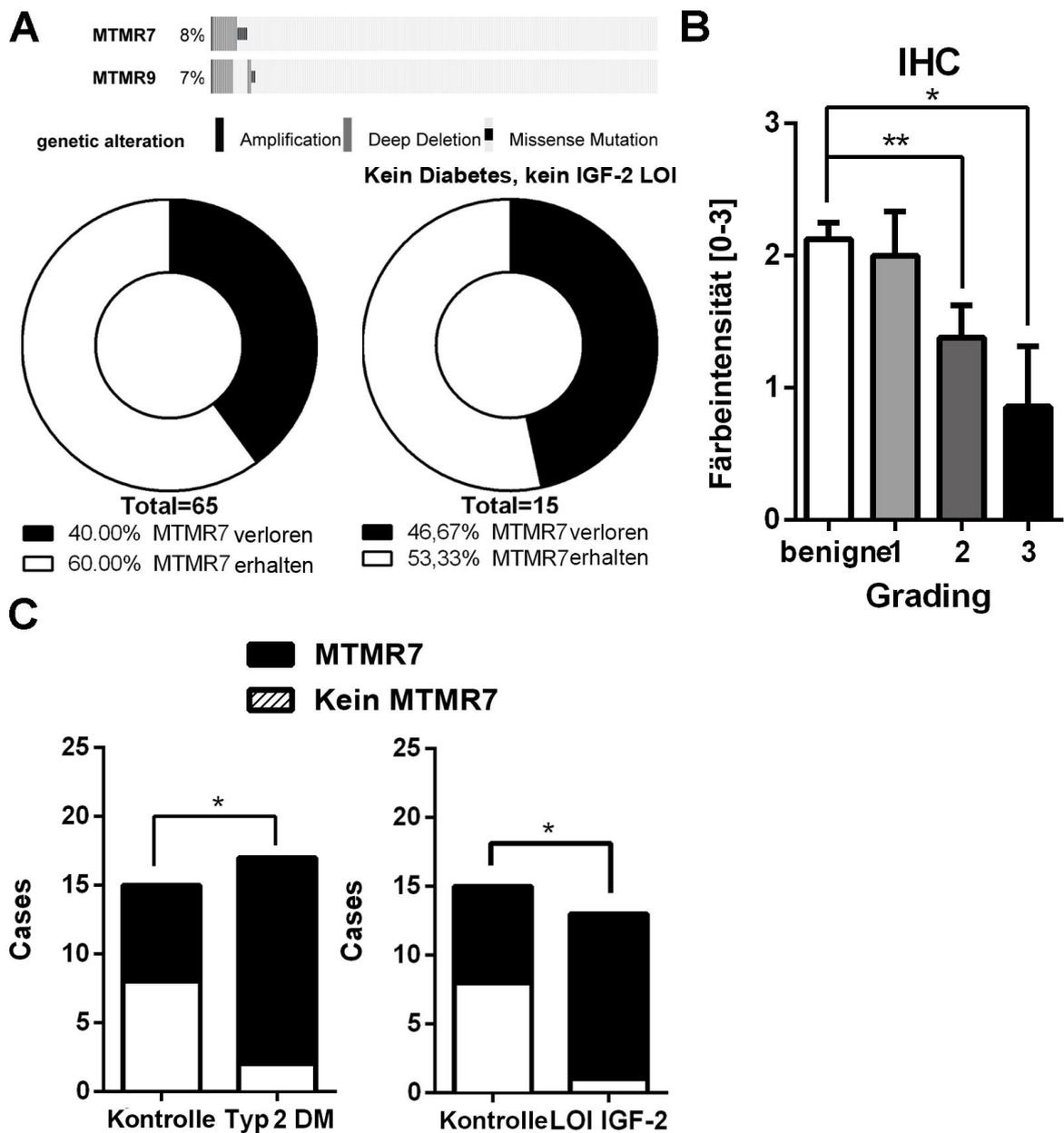


Abbildung 28. **MTMR7-Protein und mRNA-Expression im humanen kolorektalen Karzinom.** **A. oben:** Oncoprint-Datei der TCGA Provisional Datenbank für humanes kolorektales Karzinom des Onlineportals cbioportal. 8% der Tumorproben weisen Deletionen oder Missense Mutationen des MTMR7 Gens auf. Dieses Ereignis korreliert mit Veränderungen des MTMR9-Gens. **unten:** Der Verlust des MTMR7-Proteins lässt sich in 40% der kolorektalen Karzinome nachweisen. Ein Kollektiv ohne Ras-Mutation, Typ 2 Diabetes oder IGF-2 LOI verhält sich ähnlich. **B: Die MTMR7-Protein-Expression korreliert negativ mit dem Differenzierungsgrad der entsprechenden Tumorprobe.** Dargestellt ist die statistische Auswertung eines Scores von 0 bis 3 der Intensität der immunhistochemischen Färbung im Gewebe gesunder Kontrollen und in kolorektalem Karzinom. **C: Typ 2 Diabetes Mellitus (links) und loss of imprinting des IGF-2 korrelieren mit einer verminderten MTMR7-Proteinexpression.** Dargestellt ist der Vergleich der dichotomen Auswertung der MTMR7 Färbung in Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus ohne KRAS-Mutation oder IGF-2 LOI oder von Patienten mit IGF-2 LOI ohne Diabetes oder Ras-Mutation mit einer Kontrollgruppe ohne Diabetes, Ras-Mutation oder IGF-2 LOI.

atenbankrecherche für MTMR7-Mutationen in humanen soliden Tumoren

Die Suche nach anderen Tumorentitäten, in denen MTMR7 eine potentielle Rolle spielen könnte, erfolgte mit Hilfe der Datenbank *cBio Cancer Genomics Portal* (<http://cbioportal.org>)[185,186], in der neben vollständig sequenzierten Tumorgenomen relativ großer Patientenkollektive auch Informationen über mRNA-Expression und Proteom der betreffenden Tumorproben verfügbar sind.

Hier zeigte sich eine relativ hohe Prävalenz insbesondere von Deletionen und Mutationen des MTMR7-Gens in Tumoren des Urogenitaltrakts. Die höchste Mutationsrate gastroenterologischer Tumoren findet sich in dieser Analyse mit knapp 10% im hepatozellulären Karzinom. Hier lässt sich auch ein mit dem MTMR7-Verlust einhergehendes signifikant verringertes Gesamtüberleben feststellen (14,85 Monate $n=14$ in Tumoren mit verändertem MTMR7 vs. 29.53 Monate $n=111$ in MTMR7-WT Tumoren; p 0.016, Logrank-Test). (s.Abbildung 30).

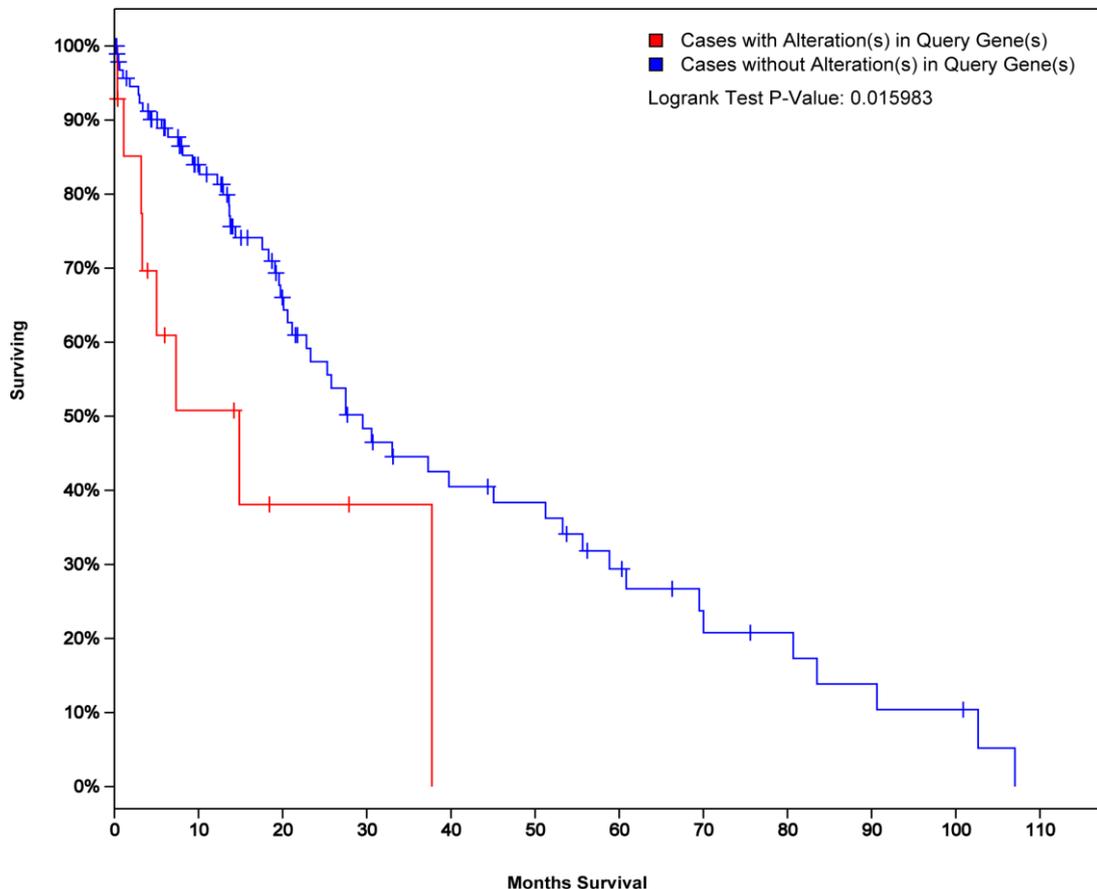


Abbildung 30. Veränderungen des MTMR7-Gens sind mit einem signifikant verringerten Gesamtüberleben von Patienten mit hepatozellulärem Karzinom assoziiert. Dargestellt ist eine Kaplan-Meier-Kurve erstellt mit Hilfe der Datenbank TCGA Liver Hepatocellular Carcinoma des Online-Portals cBioportal of Cancer Genomics. Patienten mit Veränderungen des MTMR7-Gens weisen ein signifikant schlechteres Gesamtüberleben im Vergleich zur Kontrollgruppe auf (14,85 Monate $n=14$ in Tumoren mit verändertem MTMR7 vs. 29.53 Monate $n=111$ in MTMR7-WT Tumoren; p 0.016, Logrank-Test[187]).

Eine ähnlich hohe Rate von MTMR7-Veränderungen auf genomischer Ebene lässt sich im pulmonalen Adenokarzinom feststellen und auch hier zeigt sich ein signifikant kürzeres Überleben der Patienten mit Veränderungen des MTMR7-Gens (27.14 Monate n=18 vs. 45.31 Monate n=185 Logrank Test P= 0.005)

4 DISKUSSION

4.1 Methodenkritik

Bevor die oben angesprochenen Ergebnisse einer näheren Betrachtung unterzogen werden, soll an dieser Stelle der kritischen Auseinandersetzung mit den verwendeten Methoden Platz eingeräumt werden.

Zunächst sei zu Abschnitt 3.1 angemerkt, dass es sich bei den untersuchten Gewebeproben in allen Fällen um vollständige Organe handelte, wodurch ausschließlich Gewebsgemische analysiert wurden, eine Aussage über spezifische Zellpopulationen also nur sehr eingeschränkt möglich ist. Bezüglich der analysierten Gewebeproben der db/db-Mäuse ist zu bemerken, dass die Aussagekraft bezüglich der durch metabolische Faktoren beeinflussten MTMR7-Expression neben der relativ geringen Fallzahl durch die zusätzliche Manipulation des Calmodulin-abhängigen Signaltransduktion eingeschränkt ist. Wechselwirkungen zwischen der MTMR7-Funktion und derjenigen der im verwendeten Mausmodell ausgeknockten Ca²⁺/calmodulin-abhängigen Proteinkinase (CAMK) scheinen beispielsweise angesichts der von beiden Faktoren beeinflussten ERK1/2-Aktivität[188] wahrscheinlich.

Bezüglich der Stimulationsexperimente ist zunächst zu berücksichtigen, dass die statistische Auswertung derselben mehrere methodisch bedingte Schwächen aufweist: Erstens ist die Quantifizierung der Western-Blot-Banden mit der verwendeten Software nicht standardisiert automatisch, sondern manuell durchgeführt worden, was insbesondere in Bezug auf die Festlegung des Areal für die Kalkulation der AUC eine gewisse Schwankungsbreite nach sich zieht. Die quantifizierten Werte müssen deshalb immer in Zusammenhang mit den Aufnahmen der zugehörigen Western-Blots betrachtet werden. Zweitens fand in diesem Fall keine Standardisierung der Proteinmenge auf ein Referenzprotein statt. Zwar wurde versucht die Proteinmenge durch vorherige Konzentrationsbestimmung konstant zu halten, Abweichungen können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Die Ursache hierfür liegt in der erst spät festgestellten Beeinflussung der Konzentration des ursprünglich als Referenzprotein verwendeten Proteins HSP90 durch die Manipulation der MTMR7-Expression. Ein sinnvoller Referenzprotein scheint im Nachhinein ein unphosphorylierter Bestandteil der analysierten Signalwege (bspw. ERK1/2) zu sein, der einerseits aufgrund der Bedeutung für die zelluläre Homöostase in seiner Konzentration relativ unbeeinflusst bleibt und andererseits Aussagen über die Funktionstüchtigkeit des analysierten Signalwegs zulässt. Drittens ist die geringe Anzahl durchgeführter Wiederholungen der einzelnen Experimente - n=2-5 - neben der insuffizienten Quantifizierungsmethode ein Hauptproblem, insbesondere was die Aussagekraft der statistischen Analysen angeht (beispielsweise wird als Mindestanzahl für einen aussagekräftigen t-Test eine Fallzahl von n=10 angenommen [189]). Betrachtet man jedoch die Millionen an Zellen, an denen das entsprechende Experiment unter standardisierten Bedingungen durchgeführt wurde als unabhängige Einzelexperimente, scheint die durchgeführte statistische Auswertung wenigstens gerechtfertigt. Viertens gibt es für das Zusammenfassen der Werte unterschiedlicher Zelllinien, wie es in mehreren Fällen zur statistischen Auswertung durchgeführt wurde, gute Argumente, gleichzeitig muss es jedoch zumindest kritisch betrachtet werden: Für die vorgenommene Bündelung spricht, dass ein Effekt, der auch nach Zusammenfassen unterschiedlicher Zellsysteme Bestand hat, eher als allgemeines Funktionsprinzip betrachtet werden kann, als ein solcher, der nur unter bestimmten Bedingungen reproduzierbar ist. Zusätzlich wurde darauf geachtet Zellsysteme zu kombinieren, die sich zumindest grundsätzlich ähneln und außerdem ähnliche grundlegende

Aktivierungsniveaus der analysierten Signalkaskaden aufweisen (s. Abschnitt 3.2.1). Problematisch erscheint das Zusammenfassen aus mehreren Gründen. Zum einen kann man mit Recht einwenden, es sei nur erfolgt, um die benötigte Fallzahl für statistisch signifikante Ergebnisse zu erhalten. Zum anderen handelt es sich bei näherer Betrachtung der kolorektalen Karzinomzelllinien um Vertreter unterschiedlicher Tumorentitäten: Zwar weisen beide aktivierende Ras-Mutationen auf - G12V in SW480 Zellen, G13D in HCT116. Die mikrosatelliteninstabile CIMP+ CIN-, aus einem rechtskolischen Ursprungstumor isolierte Zelllinie HCT116 [125] weist jedoch zahlreiche Charakteristika der Gruppe kolorektaler Karzinome auf, deren pathogenetisches Korrelat in Hypermethylierung strategischer DNA-Regionen besteht und die sich sowohl in Bezug auf das Therapieansprechen als auch der Prognose von MSS, CIN+ Tumoren unterscheidet, denen sich die Zelllinie SW480 zuordnen lässt (s. Abschnitt 1.1).

Die immunhistochemische Auswertung der Patientenproben weist gleichfalls einige Schwächen auf. Zunächst ist darauf hinzuweisen, dass sich die verwendete Expositionsdauer gegenüber dem Peroxidasesubstrat zwar im Rahmen des gängigen Protokolls bewegte, jedoch mit 3,5 bis 4 Minuten eher am oberen Rand anzusiedeln ist, was jedoch durchaus verständlich wird, betrachtet man die niedrige MTMR7-Expression im Gastrointestinaltrakt verglichen mit beispielsweise dem ZNS oder der Muskulatur (s. Abschnitt 7.1). Insbesondere bei der Analyse der Risikogruppen stellt diese Differenz in der Gewebsexpression eine mögliche Fehlerquelle dar: Zwar wurde eine definierte Substratexpositionszeit verwendet, dennoch diente die Färbung der mitgeführten Positivkontrolle aus glatter Muskulatur als Referenzwert, was unter Umständen eine „Unterfärbung“, insbesondere im Vergleich zu den TMAs nach sich gezogen haben könnte. Gleichzeitig wurde versucht mögliche Störfaktoren bezüglich der Risikogruppenanalyse auszuschließen. Hier seien insbesondere Insulinabhängigkeit des Diabetes, BMI und KRAS-Status genannt. Zentrale Variablen des metabolischen Status insbesondere der Typ 2-Diabetiker wie die Erkrankungsdauer bezüglich Diabetes (Surrogatparameter für die Hyperinsulinämie) und Tumorerkrankung, kardiovaskulärer Vorerkrankungen und die aktuelle metabolische Situation (beispielsweise quantifiziert durch HbA1c, Kreatinin, Gesamteiweiß und Albumin) wurden jedoch außer Acht gelassen. Des Weiteren war die Qualität des zweiten, nicht kommerziell erworbenen TMAs teils zweifelhaft, lösten sich doch einerseits zahlreiche Proben vom Objektträger, was eine korrekte Proben-Patientenzuordnung erschwerte und war andererseits eine relativ lange Substratexpositionszeit für die Färbung notwendig, was die Spezifität der Methode insgesamt erniedrigte.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich jedoch festhalten, dass sich trotz der erwähnten Mängel ein klarer Trend abzeichnete, sowohl was die Funktion des Proteins MTMR7 als auch was epidemiologische Aspekte der MTMR7-Expression im kolorektalen Karzinom angeht.

4.2 Die MTMR7/PPAR γ -Interaktion: Erklärungsansatz und Modellvorstellung

Die durchgeführten Untersuchungen liefern ein neues Bild der MTMR7-Funktion im Allgemeinen und im Kontext des kolorektalen Karzinoms im Speziellen. Zusätzlich leistet die weitere Charakterisierung der zytosolischen Interaktion mit dem Kernrezeptor PPAR γ einen Beitrag zum näheren Verständnis der zweiseitigen Effekte, die unter Therapie mit PPAR γ -Agonisten beobachtet werden [7,8,45,52,68]. Wie eingangs beschrieben wirkt sich die

pharmakologische Aktivierung des Kernrezeptors nicht nur günstig auf maligne und inflammatorische Erkrankungen aus und trägt zudem zur Resensitivierung des insulin-resistenten Körpers gegenüber den metabolischen Effekten des Hormons bei. Gleichzeitig konnten für die Therapie mit Wirkstoffen aus der Gruppe der Thiazolidinedione neben kardiovaskulären Nebenwirkungen [90,143] prokarzinogene Effekte nachgewiesen werden[95], was zur Einschränkung oder Einstellung der Anwendung dieser Wirkstoffe in der Therapie des Typ 2 Diabetes Mellitus geführt hat[95,190]. Ein genaueres Verständnis der komplexen Regulation der Aktivität des Kernrezeptors mag es ermöglichen, die PPAR γ -vermittelten Effekte insbesondere im Kontext maligner Erkrankungen in eine günstigere Richtung zu lenken. Dabei ist eben dieser Versuch gegenwärtig Gegenstand intensiver präklinischer und klinischer Forschung, sowohl bei Malignomen des Gastrointestinaltrakts als auch bei anderen soliden Tumoren, jedoch insbesondere mit Blick auf die relativ unspezifischen PPAR γ -Agonisten Rosiglitazone und Troglitazone mit eher enttäuschenden Ergebnissen[191-193]. In jüngster Zeit stehen jedoch mit den spezifischeren PPAR γ -Agonisten der 3. Generation Substanzen zur Verfügung, die eine deutlich höhere Effektivität im Rahmen der Therapie fortgeschrittener maligner Erkrankungen aufweisen. So führte die Therapie mit Efatutazone zu einer deutlichen Größenminderung in Xenograft-Modellen von Tumoren der Bauchspeicheldrüse, des Dickdarms, im anaplastischen Schilddrüsenkarzinom[194] und im Ösophaguskarzinom [195]. Die klinische Bedeutung dieser Grundlagenforschung ist gegenwärtig Gegenstand mehrerer Phase 1-2 Studien. Bei insgesamt guter Verträglichkeit zeigte sich eine Wirksamkeit in thyreoidalen Tumoren[196] und Liposarkomen[197]. Im kolorektalen Karzinom profitierten Patienten in einer Phase 2 Studie nach erzielter Krankheitskontrolle von einer Erhaltungstherapie mit Efatutazone[198], in einer Phase 1 Studie erwies sich die Kombination von Efatutazone mit dem FOLFIRI-Schema als sicher, Hinweise auf eine klinische Wirksamkeit scheinen gegeben[199]. Angesichts der heterogenen Effekte der Therapie mit PPAR γ -Agonisten unterschiedlicher Affinität und Selektivität soll hier ein weiterer Beitrag zum genaueren Verständnis der Regulation des Kernrezeptors geleistet werden.

Wie bereits beschrieben wird die PPAR γ -Aktivität durch drei Mechanismen reguliert: Ligandenbindung, post-translationale Modifikationen und die subzelluläre Lokalisation, wobei insbesondere die nukleäre Lokalisation des Rezeptors mit den positiven, antiproliferativen, Differenzierung-fördernden Effekten in Verbindung gebracht wurde [96].

Die Beobachtung, dass MTMR7 sowohl die ERK1/2-Kaskade als auch die Aktivität von AKT deutlich reduziert zusammen mit der Erkenntnis, dass der PPAR γ -Agonist Rosiglitazone einerseits die Komplexbildung zwischen Phosphatase und Kernrezeptor fördert[115] und gleichzeitig die MTMR7-vermittelten Effekte verstärkt (s. Abschnitt 7.2.3), deutet auf einen neuen Rückkopplungsmechanismus der zytosolischen PPAR γ -Fraktion auf die transkriptionelle Aktivität des Rezeptors hin. Die gewonnenen Daten legen nahe, dass die Lokalisationsänderung des Kernrezeptors von nukleär nach zytosolisch in Folge der Aktivierung der Ras-Kaskade, durch die Komplexbildung mit MTMR7 die Aktivität der Phosphatase verstärkt. Dies führt zu einem verminderten Aktivitätsniveau des MAPK-Signalwegs, wodurch die nukleäre Lokalisation des Rezeptors und seine transkriptionelle Aktivität gefördert werden. Auch wenn dies weder durch die Analyse des Phosphorylierungsstatus` der Kinase MEK1/2, noch durch subzelluläre Fraktionierung und Analyse der nukleären und zytosolischen PPAR γ -Fraktion nach MTMR7-Transfektion gezeigt wurde, so legen doch die verminderte Aktivierung des MEK-Substrates ERK1/2 und der Nachweis einer erhöhten PPAR-Response-Element-(PPRE)-Aktivität durch M. Söhn[200]

diese Rückkopplungsschleife nahe. MTMR7 scheint also ein regulierendes Element der PPAR γ -Lokalisation zu sein, was jedoch durch genauere Analyse der zytosolischen und nukleären PPAR γ -Fraktion nach Änderung der MTMR7-Menge zu zeigen bleibt. Ein weiterer Mechanismus, durch den die MTMR7-induzierte ERK-Hemmung direkt zu einer erhöhten PPAR-Aktivität führen könnte, ist die Reduzierung der in der Einleitung beschriebenen PPAR γ -Phosphorylierung durch ERK1/2[96], was durch Analyse des PPAR γ -Phosphorylierungsniveaus nach MTMR7-Transfektion und EGF-Stimulation relativ leicht zu überprüfen sein sollte.

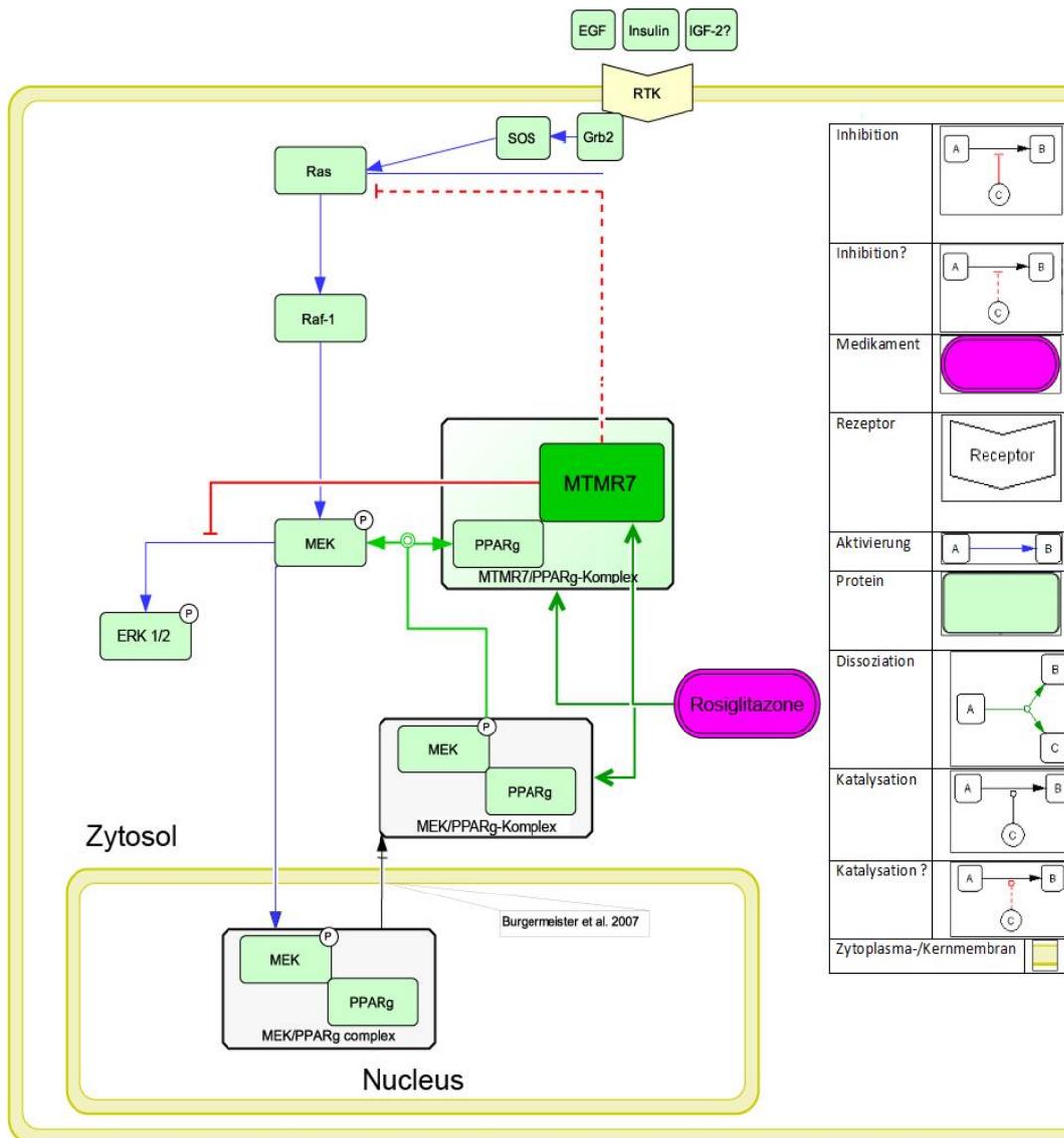


Abbildung 31. **Die MTMR7-PPAR γ -Interaktion.** Dargestellt ist die Integration der MTMR7-Funktion in das Modell der Interaktion zwischen der Ras-Kaskade-aktivierten Kinase MEK1/2 und dem Kernrezeptor PPAR γ . Der Nachweis der verminderten ERK1/2-Phosphorylierung in Folge der MTMR7-Überexpression deutet auf eine verminderte MEK1/2-Aktivität hin, was eine Reduktion des zytosolischen Transports von PPAR γ zur Folge haben sollte. Gleichzeitig wird die Aktivität von MTMR7 durch die Komplexbildung mit PPAR γ verstärkt, welche wiederum durch den PPAR γ -Agonisten Rosiglitazone gefördert wird. MTMR7 ist also Teil einer positiven Rückkopplungsschleife des Kernrezeptors.

Der dritte Mechanismus, durch den MTMR7 zu einer Stabilisierung der transkriptionellen Aktivität des Kernrezeptors beitragen könnte, ist die Regulation des zellulären HSP90-Gehalts. In einer aktuellen Arbeit, in der die Rolle von HSP90 und PPAR γ im Rahmen der Nichtalkoholischen Fettlebererkrankung untersucht wurde, gelang es Wheeler et al. zu zeigen, dass HSP90 die PPAR γ -Aktivität in vivo und in vitro positiv reguliert[104]. Wenig später konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit dem HSP90-Inhibitor Geldanamycin zu einer Hemmung der PPRE-Aktivität und der assoziierten Differenzierung der Adipozyten führt[201]. Für diese Arbeit ist es von besonderem Interesse, dass Wheeler et al. als zelluläres Modell HEK293-Zellen verwendeten. Diese tragen zwar keine Mutation im T-Antigen, wie die von mir verwendete Zelllinie, entsprechen aber ansonsten den in dieser Arbeit verwendeten HEK293-T-Zellen. Ergänzt man die Ergebnisse von Wheeler um die hier gewonnenen, so zeichnet sich folgendes Bild: Die MTMR7-Überexpression führt zu einem Anstieg des HSP90-Gehalts, was zusammen mit der oben diskutierten ERK1/2-Hemmung eine Steigerung der PPRE-Aktivität nach sich zieht. Gleichzeitig ist die Bedeutung dieser Hochregulierung des HSP90-Proteingehalts zumindest im Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom fraglich, konnte er doch nicht für die beiden Zelllinien HCT116 und SW480 gezeigt werden.

Ein weiterer Aspekt der Regulation des HSP90/PPAR γ -Zusammenspiels durch MTMR7 findet sich in dem Fakt, dass sowohl in HEK293T als auch in kolorektalen Karzinomzellen der Rosiglitazone-vermittelte Anstieg des HSP90-Gehalts durch MTMR7-Überexpression verhindert werden kann. Dieser Anstieg des HSP90-Gehalts als Antwort auf eine PPAR γ -Agonistherapie konnte bisher im Zusammenhang mit der endothelialen NO-Produktion für den PPAR γ -Liganden 15d-PGJ2 gezeigt werden. In der gleichen Arbeit ließ sich dieser Effekt jedoch nicht für Rosiglitazone nachweisen[202]. Allerdings erfolgte in der beschriebenen Arbeit die Stimulation mit dem jeweiligen Agonisten für jeweils 24h, während in dieser Arbeit lediglich 1h Expositionsdauer bestand. Es handelt sich also bei diesem rapide vermittelten Anstieg des HSP90-Gehalts innerhalb 1h nach Stimulationsbeginn mit Rosiglitazone um einen für diesen PPAR γ -Agonisten bisher nicht beschriebenen Effekt. Der kurze zeitliche Zusammenhang deutet auf eine post-translationale Stabilisierung auf Proteinebene hin, die zu einer reduzierten Proteindegradation führen könnte.

Es lässt sich also festhalten, dass zumindest in HEK293T-Zellen MTMR7 einerseits durch Hemmung der MAPK-Signaltransduktion und andererseits durch Erhöhung des zellulären HSP90-Gehalts die PPAR γ -Aktivität fördert, ein Überschießen des letztgenannten Mechanismus` durch Rosiglitazone-Stimulation jedoch hemmt.

Es ist hervorzuheben, dass der für den HSP90-Nachweis verwendete Antikörper weder zwischen den beiden Proteinvarianten α und β unterscheiden kann noch dass es möglich ist eine Aussage über den Aktivierungszustand des Chaperons zu treffen. Um weitere Aussagen über den Effekt der MTMR7-Funktion auf die HSP90-Regulation zu treffen, wäre zudem eine Analyse der HSP90-bindenden Co-Chaperone vonnöten. Von besonderem Interesse im vorliegenden Zusammenhang wäre hierbei die Analyse der mit HSP90 interagierenden Faktoren Cdc37- und Aha1, die insbesondere im Zusammenhang mit der Stabilisierung und korrekten Faltung von Proteinkinasen durch HSP90 ihre Bedeutung haben[203]. Neben der Beteiligung an der PPAR γ -Regulation ist dies die zweite Schnittstelle zwischen HSP90, MTMR7 und der hier durchgeführten Analyse der beiden Rezeptortyrosinkinase-aktivierten Signalkaskaden, denn HSP90 stellt als Chaperon zahlreicher Kinasen einen zentralen Regulator der Homöostase intrazellulärer Signalkaskaden dar. Beispielsweise zählen zu den durch HSP90 stabilisierten Faktoren der EGF- und Insulin- bzw. IGF-Rezeptor, Kinasen wie AKT, S6K, Raf und MEK1/2 und ihre onkogenen Mutationsprodukte[204] und die gezielte Inhibition der HSP90-

Kinase-Interaktion in soliden Tumoren ist gegenwärtig Gegenstand zahlreicher klinischer Studien[205]. Interessanterweise lässt sich nach Analyse der aus cBioportal gewonnenen mRNA-Expressionsdaten in Proben kolorektaler Karzinome eine negative Korrelation zwischen der MTMR7 und Cdc37-Expression (Pearman's Correlation -0,96 bzw. -0,49), dem Co-Chaperon, über das die Interaktion zwischen HSP90 und Protein-Kinasen vermittelt wird[203,205], nachweisen. Es lässt sich also spekulieren, dass die MTMR7-Expression im kolorektalen Karzinom nicht nur das Aktivitätsniveau für das Tumorwachstum zentraler Kinasen hemmt, sondern zusätzlich mit ihrer Destabilisierung durch eine Reduktion der HSP90-Kinase-Interaktion einhergeht.

4.3 MTMR7 – Expression, Funktion und Regulation

Bezüglich der Gewebsexpression vervollständigt diese Arbeit die in der Erstbeschreibung vorgenommene Expressionsanalyse in murinem Gewebe. Wie von Majerus et al. 2003 beschrieben findet sich eine MTMR7-Expression auf RNA-Ebene in Hirn, Leber und Nierengewebe. Das für diese Arbeit analysierte Gonadengewebe stammte von einer weiblichen Maus, doch korrespondierend zu der von Majerus et al. beschriebenen Expression in Hodengewebe fand sich auch im murinen Eierstock eine deutliche MTMR7 mRNA-Expression. Eine weitere Übereinstimmung findet sich in der quantitativen Auswertung des RNA-Gehalts, in der sich die hohe Expression in neuronalem Gewebe bestätigte. Im Gegensatz zu den früheren MTMR7-Expressionsanalysen konnte in dieser Arbeit auch in Muskelgewebe MTMR7-mRNA nachgewiesen werden. Der Nachweis von MTMR7 mRNA in sämtlichen Abschnitten des Gastrointestinaltrakts erweitert das bekannte Expressionsmuster. Es ist anzumerken, dass die von Majerus et al. zur Analyse der Gewebsexpression verwendete Northern-Blot-Analyse im Gegensatz zum hier verwendeten PCR-Nachweis ohne MTMR7-Amplifikation auskam[136], so dass das niedrige MTMR7-Expressionsniveaus unter Umständen unter der Nachweisgrenze der verwendeten Methode lag.

Der Nachweis von MTMR7 in den humanen kolorektalen Karzinomzelllinien gibt Hinweise auf eine mögliche Rolle der Phosphatase in der Karzinogenese des kolorektalen Karzinoms. Die Änderung der MTMR7-Expression unter hyperglykämischen Bedingungen soll in einem gesonderten Abschnitt besprochen werden.

Einen Paradigmenwechsel stellen die neu gewonnenen Erkenntnisse über die Beeinflussung der ERK1/2 und AKT-vermittelten Signalkaskaden und die resultierende Reduktion der Zellwachstumsrate durch MTMR7-Überexpression dar. Während Myotubularine im Allgemeinen als das Überleben der Zelle fördernde „Survival“-Phosphatasen angesehen werden, die die AKT- bzw. mTORC-vermittelte Signaltransduktion fördern[133,137,147,206], konnte hier gezeigt werden, dass MTMR7-Überexpression das AKT-Aktivitätsniveau signifikant reduziert, das Zellwachstum hemmt und die Empfindlichkeit gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika steigert. Die zusätzliche Hemmung der AKT-abhängigen S6-Proteinaktivierung und die Reduktion des ERK1/2-Aktivitätsniveaus weisen auf die Bedeutung der Phosphatase im Zusammenspiel der PI3K-AKT-mTORC und Ras-Raf-MAPK-Achse im kolorektalen Karzinom hin[171].

Die Erkenntnis, dass MTMR7 die AKT-Aktivität in den untersuchten Zelllinien hemmt, steht in Einklang mit den Erkenntnissen von Guo et al.[162], die diesen Effekt 2013 im Rahmen der T-Zelldifferenzierung beschrieben haben. Im Gegensatz zu dieser Arbeit, können aus den hier

vorgestellten Ergebnissen Rückschlüsse auf den der Hemmung der Zellwachstum fördernden Signalkaskaden zugrunde liegenden Mechanismus gezogen werden.

Wie eingangs beschrieben ist die AKT-Aktivierung Ergebnis eines mehrschrittigen Prozesses, indem nach PtdIns(3,4,5)P₃- oder PtdIns(3,4)P₂-Bindung und Membranrekrutierung die Phosphorylierung des THR308-Rests durch PDK1 eine basale AKT-Aktivität initiiert, die dann durch eine positive Rückkopplungs-Schleife durch den mTORC2 zur THR450- und S473-Phosphorylierung und vollständigen Aktivierung der Kinase führt.

Für MTM1 konnte ein fördernder Einfluss sowohl auf die THR308- als auch bezüglich der SER473-Phosphorylierung, nicht jedoch für die des THR450-Rests gezeigt werden[147], ein Effekt, der sich auch in vitro auf Ebene der nachgeschalteten Effektorproteine nachweisen lässt[142]. Dies deutet auf einen stimulierenden Effekt oberhalb der mTORC2-Rückkopplungsschleife hin. Und in der Tat führte die Reduktion des freien PtdIns(3)P, einem Hauptsubstrat von MTM1 durch EGFP-2xFyve Überexpression, zu einer deutlichen Steigerung der THR308-Phosphorylierung von AKT nach EGF-Stimulation[147].

Die hier vorgestellten Ergebnisse legen jedoch nahe, dass MTMR7 einen AKT-hemmenden Gegenpart zu diesem Myotubularin-abhängigen Mechanismus darstellt. Wie oben beschrieben führt die MTMR7-Überexpression zum gegenteiligen Effekt bezüglich der AKT-Aktivierung, nämlich zur Reduktion sowohl der THR308- als auch der SER473-Phosphorylierung. Dies deutet wie im Fall von MTM1 auf einen Mechanismus oberhalb der mTORC2-Rückkopplungsschleife hin. Im Gegensatz zu MTM1 scheint MTMR7 diesen Effekt jedoch nicht über den sekundären Botenstoff PtdIns(3)P zu vermitteln, denn genau wie MTM1 verringert MTMR7 den PtdIns(3)P-Gehalt, was, glaubt man den Ergebnissen von Razidlo et al., zu einer Förderung der AKT-Aktivität führen müsste. Zwei alternative Erklärungsansätze liegen nun nahe: Zum einen scheint eine Reduktion des PtdIns(3,4,5)P₃ oder PtdIns(3,4)P₂ analog zur Phosphatase PTEN möglich, entweder durch direkte Dephosphorylierung oder durch Verschiebung des chemischen Gleichgewichts hin zu niedriggradiger phosphorylierten PtdIns und somit durch Reduktion des Substrat-Gehalts der PI3K. Und tatsächlich weisen MTMR7-depletierte T-Zellen einen ähnlichen Phänotyp auf wie nach PTEN-Depletion[162]. Weder in der zitierten Arbeit, noch in den von uns durchgeführten Experimenten konnte jedoch ein direkter Einfluss von MTMR7 auf den PtdIns(3,4,5)P₃ bzw. PtdIns(3,4)P₂ Gehalt nachgewiesen werden.

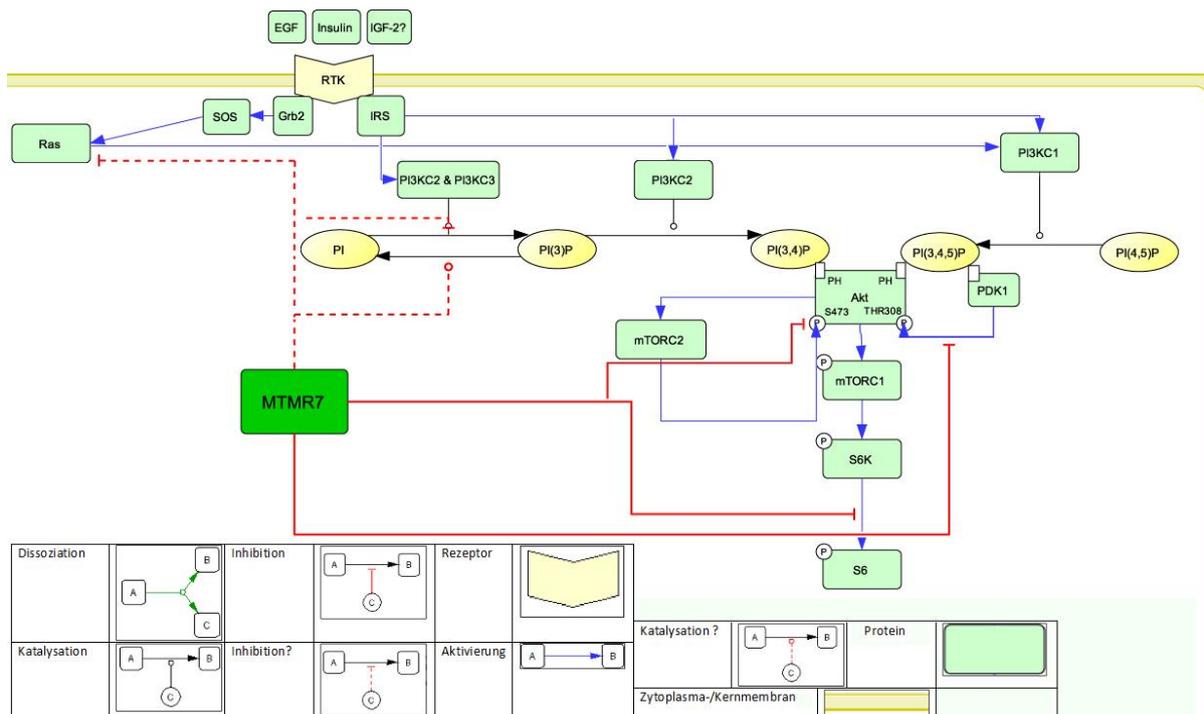


Abbildung 32. **MTMR7 hemmt die Ras- und PI3K-vermittelte AKT-Signalkaskade.** Vereinfachte Darstellung des RTK-abhängigen AKT-Signalwegs. Wie in Kapitel 7 beschrieben hemmt die MTMR7-Überexpression sowohl die PDK1 als auch die mTORC2 vermittelte AKT-Phosphorylierung und die nachgeschaltete S6-Phosphorylierung (durchgezogene rote Linien). Das Muster der verminderten AKT-Phosphorylierung deutet auf einen Mechanismus oberhalb von PDK1 hin. Die beiden wahrscheinlichsten Möglichkeiten, die Verschiebung des PI-Metabolismus und die Hemmung der Ras-Aktivität sind mit gestrichelten Linien dargestellt. Anzumerken ist, dass die Ras-Hemmung den wahrscheinlicheren Mechanismus darstellt, einerseits aufgrund der subzellulären Kompartimentierung der einzelnen PI-Metabolite und andererseits aufgrund seiner Position weit oberhalb in der Signalkaskade.

Betrachtet man jedoch die unterschiedliche Effektivität der MTMR7-Überexpression bezüglich der AKT-Aktivierung in den beiden kolorektalen Karzinomzelllinien, scheint ein anderer Mechanismus wahrscheinlich:

Wie in Tabelle 1 beschrieben unterscheiden sich die beiden kolorektalen Karzinomzelllinien bezüglich des PI3K-Mutationsstatus. Die in HCT116 Zellen vorliegende PI3CA H1047R Mutation hat eine erhöhte PI3K-Aktivität unabhängig vom Ras-Aktivitätsstatus zur Folge[121], während in SW480 keine PI3CA Mutation vorliegt. Wie oben beschrieben ist die Effektstärke in SW480-Zellen signifikant größer als in der Zelllinie HCT116. Wenn nun MTMR7 in Zellen eine größere Effektivität aufweist, in denen die Ras-Mutation funktionell stärker zum Ausdruck kommt (SW480), so scheint eine Beeinflussung des Ras-Aktivitätsniveaus durch MTMR7 zumindest wahrscheinlich und böte gleichzeitig eine Erklärung für die verminderte ERK1/2-Antwort auf EGF-Stimulation in MTMR7-überexprimierenden Zellen. Und in der Tat gelang es M. Söhn[200] eine verminderte Ras-Expression nach MTMR7-Transfection nachzuweisen.

Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt bietet die Förderung der PPAR γ -Funktion durch MTMR7. In einer anderen Arbeit unserer Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PPAR γ zu einer Reduktion der K-Ras-Expression führt[64]. Die Steigerung der

PPAR γ -Aktivität durch den MTMR7-vermittelten Anstieg des zellulären HSP90-Gehalts könnte also zu einer verminderten Ras-Expression und somit in einer Art positiven Rückkopplung zu einer verminderten MEK1/2-Aktivität führen, was einerseits den erniedrigten Phospho-ERK1/2-Niveau nach EGF-Stimulation erklärte und gleichzeitig die nukleäre Lokalisation des Kernrezeptors förderte.

Bezüglich der Verstärkung der MTMR7-induzierten Hemmung der PI3K- und ERK1/2-vermittelten Signaltransduktion durch Präinkubation mit Rosiglitazone gibt die Analyse des PI(3)P-ELISAs eine Hinweis auf den zugrundeliegenden Mechanismus: Die Stimulation der Zellen mit Rosiglitazone führt in MTMR7-überexprimierenden Zellen zu einem – wenn auch nicht signifikanten – Anstieg der PtdIns(3)P-Konzentration. Gleichzeitig führt die Rosiglitazone-Behandlung zu einer Verstärkung der Komplexbildung zwischen MTMR7 und PPAR γ . Der Schluss liegt also nahe, dass die Komplexbildung zwischen PPAR γ und MTMR7 die Phosphataseaktivität des Myotubularins hemmt, den PtdIns(3)P-Gehalt erhöht und in Analogie zu dem von Guo et al. beschriebenen Effekt die AKT-Aktivität hemmt. Dies stellt auch eine Erklärung für den Umstand dar, dass sich eine Steigerung der MTMR7-vermittelten Hemmung der ERK1/2-Phosphorylierung nicht nachweisen lässt⁶.

Welchen Erklärungsansatz man auch zugrunde legen mag, es lässt sich in jedem Fall festhalten, dass die Überexpression von MTMR7 zu einer verminderten Aktivität sowohl der PI3K-AKT-mTORC-Achse als auch des Ras-Raf-Erk1/2-Signalwegs führt. Dies macht die Phosphatase zu einem aussichtsreichen Ansatzpunkt neuer zielgerichteter Therapien, welche helfen könnte entscheidende Schwächen der mTOR-Inhibition in soliden Tumoren auszugleichen:

Zunächst führt die mTORC1-Hemmung durch Rapamycin und seine Derivate zu einer vermehrten PI3K-Aktivität und somit zu einer vermehrten Aktivierung AKT-unabhängiger Effektor-Signalwege, was als eine der Ursachen für die geringe Effektivität dieser Substanzgruppe in epithelialen Neoplasien angesehen wird[207]. Außerdem führt die mTORC1-Hemmung zu einer gesteigerten ERK-Aktivität[208], ein Grund für die synergistischen Effekte von MEK1/2-Inhibitoren und Hemmstoffen der PI3K-AKT-mTORC-Achse[208,209]. Die MTMR7-Überexpression verbindet die beiden genannten Wirkprinzipien, wird doch sowohl die mTORC-vermittelte Signaltransduktion via S6Kinase, als auch die ERK-Aktivität gehemmt. Insbesondere die mTORC-Hemmung lässt sich indirekt auch in den Ergebnissen der Zytotoxizitätsassays wiederfinden: Mit MTMR7 transfizierte Zellen verhalten sich hier wie mit dem mTORC-Inhibitor Everolimus behandelte Zellen, was auf eine mTOR-inhibitorische Rolle des MTMR7-Proteins in vitro hinweist. Wie in 7.4 beschrieben führt die reaktive Aktivierung kompensatorischer Signalkaskaden in Folge einer mTORC-Hemmung durch Everolimus zu einer paradoxen Steigerung der zellulären Proliferationsrate[184]. Wie oben beschrieben hemmt MTMR7 eben jene Signalkaskaden, die für die gesteigerte Proliferationsrate verantwortlich sind. Ein additiver Effekt bezüglich der kombinierten MTMR7-Überexpression und mTORC-Inhibition durch Everolimus ist jedoch angesichts der MTMR7-vermittelten Wirkung oberhalb des mTOR-Komplexes nicht zu erwarten.[171]

⁶ Wobei anzumerken ist, dass eine andere Erklärung für die geringere Effektstärke die ERK1/2-Phosphorylierung als Folge der Rosiglitazone-Behandlung selbst darstellt, was die Differenz zwischen den mit Rosiglitazone präinkubierten Zellen und denjenigen ohne Vorbehandlung prinzipiell verkleinert.

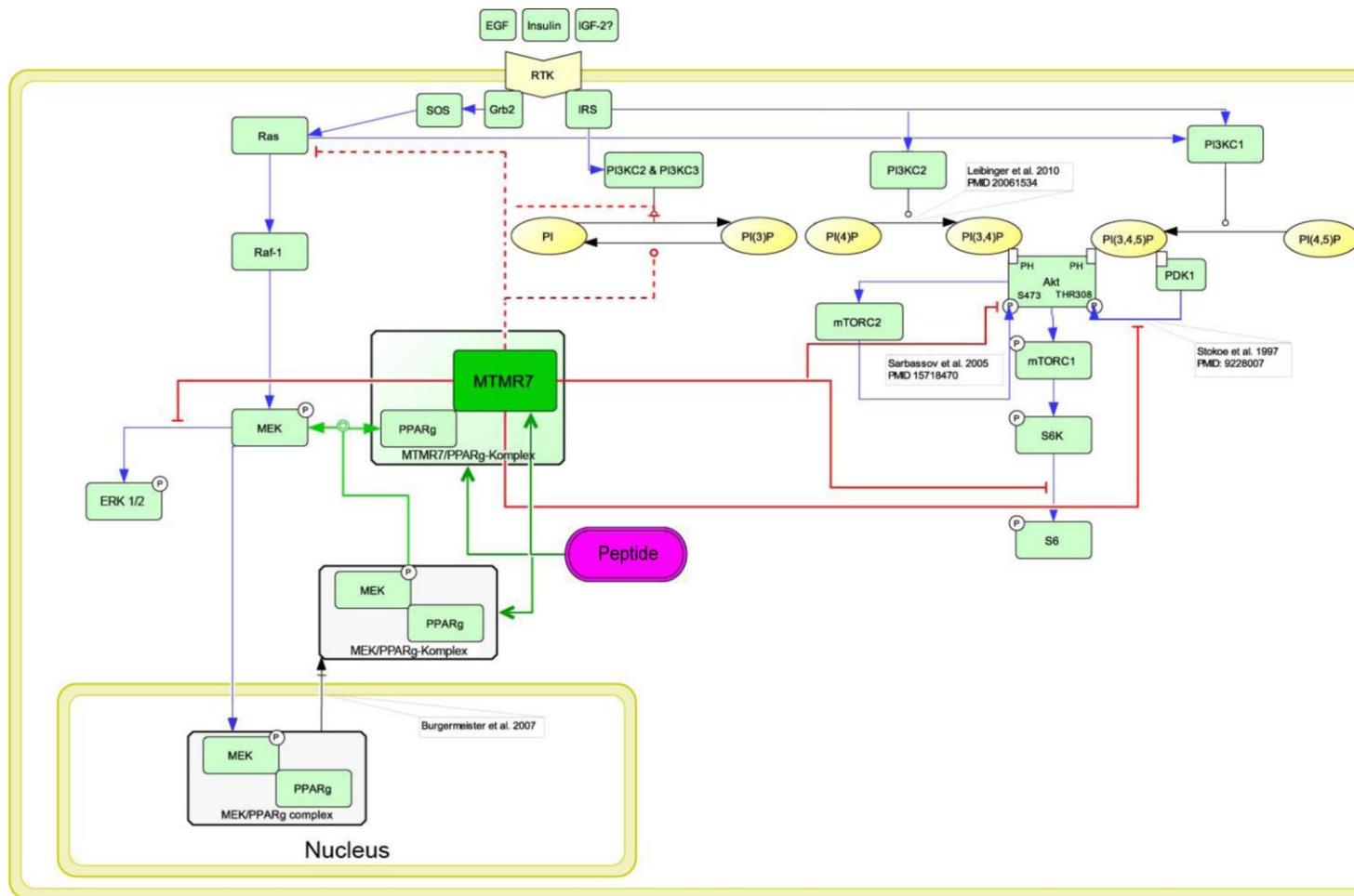


Abbildung 33. **MTMR7 hemmt zentrale Aspekte der MAPK- und AKT-assoziierten Signalkaskaden.** Dargestellt ist die Integration von MTMR7 in die RTK-aktivierten Signalkaskaden und die MEK1/2-abhängige PPAR γ -Regulation. Die Darstellung orientiert sich an denen der KEGG-Pathway-Database. Zentrale Aspekte der Signaltransduktion wurden mit entsprechenden Belegen eingefügt (graue Kästen). MTMR7 hemmt sowohl die PDK1- als auch die mTORC2-vermittelte AKT-Phosphorylierung ebenso wie die Aktivierung von ERK1/2. Dieser Mechanismus wird durch die Komplexbildung mit PPAR γ verstärkt, die wiederum durch Rosiglitazone gefördert werden kann. Die Hemmung der MAPK-Kaskade sollte zu einer

Abbildung 34. Reversion des zytosolischen Transports von PPAR γ und somit zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität führen. Mögliche Mechanismen der MTMR7-vermittelten Effekte sind einerseits die Verschiebung des PI-Gehalts hin zu niedriggradiger phosphorylierten Formen und andererseits eine direkte Hemmung der Ras-Aktivität, was sowohl den Effekt auf die MAPK-Kaskade als auch die Hemmung des AKT-Signalwegs erklärte.

4.4 MTMR7 im kolorektalen Karzinom

Der oben beschriebene Erklärungsansatz für die mit MTMR7-Überexpression assoziierten Effekte wirft angesichts der Bedeutung beider involvierter Signalkaskaden für das Zellwachstum im humanen kolorektalen Karzinom und der Anstrengungen durch Hemmung eben dieser Mechanismen, das Überleben betroffener Patienten zu verbessern, Fragen nach der Rolle der Phosphatase im humanen Tumor auf.

Dabei unterstreicht die große Gruppe der Patienten, die MTMR7 auf Proteinebene nicht mehr exprimieren, die Rolle des Myotubularins als Tumorsuppressor, dessen Eliminierung einen Überlebensvorteil für die Tumorzelle darstellt. Gleichzeitig gibt die Inkongruenz der Verlustrate auf Proteinebene (etwa 40%) mit der in den Datenbanken gefundenen Mutationsraten (etwa 10% im kolorektalen Karzinom) einen Hinweis darauf, dass neben dem Verlust auf genomischer Ebene weitere Mechanismen an der Unterdrückung des MTMR7-Protein-Gehalts beteiligt sein müssen.⁷ Gleichzeitig stellte sich die Frage nach Risikofaktoren für den MTMR7-Expressionsverlust. Dabei lieferte die Erkenntnis, dass MTMR7 insbesondere Insulin- und IGF-1-aktivierte Signalkaskaden manipuliert, den Ansatzpunkt für die Hypothese, dass insbesondere Tumore mit einem erhöhten Aktivitätsniveau der genannten Signalkaskaden von einem MTMR7-Verlust profitierten, da dies zu einer vermehrten Wachstumsstimulation führte. In diesem Zusammenhang schienen einerseits Patienten mit Typ 2 Diabetes mellitus und daraus resultierender Hyperinsulinämie ein vielversprechendes Kollektiv⁸ darzustellen. Eine andere Gruppe waren Patienten, deren Tumore durch LOI des IGF-2 gekennzeichnet sind, was zu einer gesteigerten auto- und parakrinen Sekretion des Wachstumsfaktors und somit zu einer vermehrten Aktivität der PI3K-Kaskade führt. Tatsächlich fand sich in beiden Gruppen eine signifikant niedrigere Rate an MTMR7-exprimierenden Tumoren als im Vergleichskollektiv (s. Abschnitt 7.5.2). Zu bemerken ist, dass der MTMR7-Verlust ein tumorspezifischer Effekt zu sein scheint, ließ sich eine positive MTMR7-Proteinfärbung doch in allen Proben in der normalen Mukosa nachweisen.⁹ Neben der Abhängigkeit der MTMR7-Expression von endokrinen Faktoren ließ sich ein Zusammenhang zwischen der MTMR7-Verlustrate und dem Differenzierungsgrad der betreffenden Probe nachweisen. Tumore mit höherem Entartungsgrad wiesen auch eine höhere MTMR7-Verlustrate auf. Da es sich bei der kolorektalen Karzinogenese um einen mehrstufigen Prozess handelt, in dem die maligne Entartung mit einer zunehmenden Rate genetischer Veränderungen einhergeht, ist dies zu erwarten. Die dargestellten Daten zum Zellwachstum scheinen außerdem einen Überlebensvorteil für MTMR7-überexprimierende Karzinomzellen zu zeigen, sodass der bestehende Selektionsdruck zu einer Akkumulation MTMR7-negativer Zellen im progredient entartenden Tumorgewebeverband führen sollte.¹⁰ Angesichts der Funktion der Phosphatase ist eher auf den genannten Selektionsvorteil als

⁷ Gleichzeitig sollte man nicht außer Acht lassen, dass unspezifische Färbungen und – insbesondere bei manuellem Vorgehen – zu lange Exposition gegenüber dem Peroxidasesubstrat zu einem höheren Anteil MTMR7-positiver Fälle geführt haben könnte. Die Differenz könnte also noch deutlich größer sein.

⁸ Die Effekte der Hyperinsulinämie unter Bedingungen der Insulinresistenz sind in Kapitel 8.6 zusammengefasst.

⁹ Selbstverständlich sind die getroffenen Aussagen im Licht der relativ geringen Fallzahlen einerseits und in der möglicherweise recht heterogenen Ergebnisse der manuell durchgeführten Färbung zu sehen.

¹⁰ Ein kausaler Zusammenhang zur Karzinogenese lässt sich selbstverständlich nicht nachweisen, ein erster Schritt in diese Richtung wäre jedoch die Analyse des MTMR7-Status in kolorektalen Adenomen und die Etablierung eines MTMR7-defizienten Mausmodells.

Ursache für die steigende MTMR7-Verlustrate zu schließen als auf einen ursächlichen Effekt, was die Förderung der Entartung angeht¹¹.

Zusätzlich stellt sich die Frage nach der Bedeutung des Proteins MTMR7 als prädiktivem Marker, sowohl was das Therapieansprechen angeht als auch was das Klinische Ergebnis betrifft. Hierzu lässt sich anhand der bis jetzt vorliegenden Daten nur sehr eingeschränkt eine Aussage treffen, da die für die analysierten Proben verfügbaren Datensätze weder Aussagen über das Überleben der Patienten nach Diagnosestellung und Therapie noch über das Ansprechen auf eine Chemotherapie¹² enthielten. Betrachtet man jedoch Analysen, in denen der Verlust des das MTMR7-Gen enthaltenden Arms des Chromosoms 8 mit der Prognose im kolorektalen Karzinom korreliert wurde, so lässt sich zwar feststellen, dass insbesondere LOH ein Mechanismus des MTMR7 Verlusts auf genomischer Ebene darstellt. Ein Zusammenhang zwischen LOH der MTMR7-enthaltenen Region und der Prognose des Tumorpatienten ließ sich jedoch nicht feststellen[210-212].

Im Gegensatz zum kolorektalen Karzinom besteht sowohl im fortgeschrittenen Mamma-Karzinom[213,214] als auch im Prostatakarzinom[215] ein eindeutigerer, negativer Zusammenhang zwischen dem Verlust der für MTMR7-kodierenden Region und der Prognose der betreffenden Patienten. Betrachtet man das unter 7.7 beschriebene Screening der MTMR7-Expressionsanalyse, so findet sich in diesen beiden Tumorentitäten die höchste Rate an Veränderungen der MTMR7-Expression: Während im Prostatakarzinom insbesondere die MTMR7-Deletion ein häufiges Ereignis ist, findet sich in 20% der Mamma-Karzinome eine Amplifikation der MTMR7-Expression¹³. In diesem Screening zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen einer veränderten MTMR7-Expression (insbesondere einer Deletion) und einer Veränderung der Überlebensrate sowohl im hepatozellulären Karzinom als auch im pulmonalen Adenokarzinom. In diesen beiden Tumorentitäten zeigte sich wie schon beschrieben ein inverser Zusammenhang zwischen MTMR7-Verlust und Gesamtüberleben. Betrachtet man die Bedeutung der Insulinwirkung für das hepatische Gewebe und die Funktion von MTMR7 in diesem Zusammenhang, so könnte hier eine mögliche Erklärung für den Effekt auf die Aggressivität des Tumors liegen. Gleichzeitig kann man von der Bedeutung des Pan-Rezeptortyrosinkinaseinhibitors Sorafenib für die Therapie des HCCs auf die Relevanz der Phosphatase für die Wachstumsinhibition des hepatischen Tumors schließen. Es bleibt jedoch festzuhalten, dass die Region auf Chromosom 8, in der das MTMR7-Gen lokalisiert ist, relativ häufig im HCC verloren geht[216] und dass der Verlust einiger Produkte dieser Genregion, beispielsweise des in unmittelbarer Nachbarschaft des MTMR7-Gens lokalisierten Proteins ZDHHC2, mit einer schlechteren Prognose in Verbindung gebracht werden konnte[217]. Insgesamt lässt sich jedoch sagen, dass sich mit MTMR7 ein weiterer tumorsuppressiver Kandidat in dieser für Veränderungen anfälligen Region des Chromosoms 8p22 verorten lässt – neben etablierten Faktoren wie MCPH1, TUSC3, KIAA1456 und ZDHHC2.

Die Tatsache, dass sich MTMR7 in einem großen Teil der Tumorproben im kolorektalen Karzinom nachweisen lässt, lässt die Möglichkeit der Beeinflussung der MTMR7-Aktivität in der Tumortherapie in den Fokus weiterer Betrachtungen rücken. Ein positiver Effekt auf die Chemosensitivität der beiden kolorektalen Karzinomzelllinien ist in Kapitel 7.4 dargestellt.

¹¹ Hier wäre eine Beteiligung an DNA-Reparatur, Methylierung oder ähnlichen Mechanismen zu fordern.

¹² Zwar waren Daten zur Vollständigkeit der Tumorresektion enthalten, hier zeigte sich jedoch kein Zusammenhang zwischen MTMR7-Expression und R-Status.

¹³ Allerdings in einer kleinen Kohorte (n=20).

Dieser scheint zumindest im Falle von Cisplatin durch eine zusätzliche Rosiglitazontherapie in MTMR7-transfizierten Zellen noch zu steigern zu sein. Allerdings stellt sich an dieser Stelle die prinzipielle Frage nach der Reliabilität des verwendeten Modells. Die verwendeten Chemotherapeutika-Konzentrationen waren zwar nicht beliebig ausgewählt, in wie weit diese denjenigen im Tumor in vivo nahekommen und ob sich die Ergebnisse aus einer mehr oder weniger monoklonalen Zellkultur auf einen heterogenen Zellverband im Karzinom übertragen lassen, sind nur zwei mögliche Kritikpunkte. Zudem ließ sich der beschriebene Effekt ausschließlich bei niedrigen Chemotherapeutikadosen nachweisen. Dennoch stellt sich die Frage, ob eine Ergänzung gängiger Chemotherapieschemata um Rosiglitazone ein verbessertes Ansprechen mit sich brächte.

4.5 MTMR7 und Diabetes

Wie eingangs beschrieben, stellt das Vorhandensein eines Typ 2 Diabetes Mellitus einen unabhängigen Risikofaktor für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms[218] und einen negativen prognostischen Marker Tumorpatienten dar[218,219]. Neben Veränderungen des Mikrobioms, des Immunsystems und inflammatorischen Status sowie Veränderungen der Adipokin-Homöostase ist es das alterierte Insulin- und IGF-Signaling[220], dem eine besondere Rolle in der Karzinogenese unter hyperinsulinämischen Bedingungen zugesprochen wird. Sowohl in normaler Mukosa als auch im kolorektalen Karzinom stimuliert Insulin das Zellwachstum in vitro, entweder direkt durch eine Erhöhung der Aktivität des MAPK-Signalwegs oder durch eine erhöhte Konzentration des IGF-1[221]. Dabei kommt der PI3K-vermittelten AKT-Signalkaskade eine besondere Rolle zu. Insbesondere über die Isoformen AKT2 und AKT3 wird – beispielsweise im Skelettmuskel – die insulinabhängige Fusion von mit GLUT4 bestückten Vesikeln und der daraus resultierende Glucose-Einstrom in die entsprechende Zelle reguliert[129,130,222]. Bemerkenswerterweise findet sich in insulinresistenten Individuen eine Störung eben jener Isoformen, während die AKT1-vermittelte Signalkaskade unbeeinträchtigt bleibt [130]. Ihre Hauptaufgabe besteht in der Vermittlung Zellwachstum fördernder Stimuli[223], sodass unter hyperinsulinämischen Bedingungen in insulinresistenten Individuen zwar die Insulin-vermittelte metabolische Funktion beeinträchtigt ist, nicht jedoch die Zellwachstum fördernde Wirkung des Hormons. Zusätzlich scheint eine vermehrte Insulinexposition in kolorektalen Karzinomzelllinien nicht wie in ihren nicht maligne-transformierten Gegenstücken zu einem insulinresistenten Phänotyp zu führen, sondern die entarteten Zellen scheinen von den zusätzlichen Wachstumsstimuli und Energieangebot in vivo zu profitieren[177].

Durch PPAR γ als antidiabetischen, antiinflammatorischen und antiproliferativen Faktor bestand bereits eine Verbindung zwischen MTMR7-Regulation, Metabolismus und Karzinogenese. Hierbei unterstreicht die Beteiligung der Phosphatase an der Manipulation signaltransduzierender Faktoren sowohl der Insulin- als auch der IGF-Rezeptor-vermittelten Signalkaskade die Verbindung zwischen Metabolismus und Karzinogenese.

Die Experimente, die in diesem Zusammenhang durchgeführt wurden, können nur ein kurzes Schlaglicht auf die Rolle des MTMR7-Proteins an der Schnittstelle zwischen Störungen des Stoffwechsels und des Zellwachstums werfen, welches im Folgenden dargestellt werden soll.

Genau wie die Stimulation mit EGF führte die Behandlung von Zellen mit Insulin zu einer erhöhten Phosphorylierung der PI3K-AKT-mTORC-Achse und genau wie im Fall von EGF reduzierte MTMR7 die Phosphorylierung der für das Zellwachstum entscheidenden Faktoren AKT und des S6-Proteins (s. Abbildungen 14 und 15). Entsprechend führte die Überexpression

von MTMR7 zu einer weniger starken Zunahme des Zellwachstums unter hyperinsulinämischen Bedingungen¹⁴. (s. Abbildung 24) Es scheint also, als fungiere MTMR7 als Gegenspieler der anabolen Insulineffekte, zumindest was kolorektale Karzinomzelllinien in vitro angeht[171]. Da die Analyse des AKT-Phosphorylierungsstatus nicht mit einem isoformspezifischen Antikörper durchgeführt wurde, darf außerdem ein Einfluss auf die Glukosehomöostase vermutet werden. Die MTMR7-Überexpression sollte über die AKT-Hemmung zu einem verminderten GLUT4-Einbau in die Zellmembran und folglich zu einem erniedrigten Glucose-Einstrom führen. MTMR7-Verlust trüge also zu einer verminderten Glukoseresorption aus dem Darmlumen bei. Interessanterweise zeigt sich bei der quantitativen Analyse der mRNA-Expression in verschiedenen murinen Geweben, dass sich die MTMR7-Expression unter Bedingungen des metabolischen Syndroms in Hirn und Darm, nicht aber in den beiden für die Glukosehomöostase relevanten Organen Muskel und Leber signifikant ändert. Der Zusammenhang scheint einfach: Steigt die Blutglukosekonzentration dauerhaft an, so hat dies auch eine erhöhte MTMR7-Expression im Darm zur Folge. Dies könnte zumindest im Darmepithel einen protektiven Einfluss sowohl im Sinne einer verminderten Glukoseaufnahme als in Bezug auf die anabole Wirkung der begleitenden Hyperinsulinämie haben.¹⁵ Diese Beobachtung scheint durch die immunhistochemische Färbung des Darmepithels von Typ-2 Diabetikern bestätigt zu werden. Auch in diesen Proben scheint die MTMR7-Proteinexpression höher zu sein als in den nichtdiabetischen Kontrollen.¹⁶ Passend hierzu fand sich eine höhere MTMR7-mRNA-Expression in der Kolonschleimhaut derjenigen Mäuse, die neben dem Verlust der Calmodulinkinase eine homozygote Mutation des Leptinrezeptors aufwiesen. In der Zusammenschau der Ergebnisse könnte dies als antidiabetische Gegenregulation im hyperinsulinämischen Individuum zu werten sein, könnte doch durch die verminderte AKT-Aktivität die Vesikelfusion und somit die GLUT4-Dichte darmlumenseitig vermindert sein. Dieser Effekt ist scheinbar in Leber und Muskulatur nicht nachweisbar, sodass die Glukoseresorption aus dem Blut von MTMR7 unbeeinflusst bleiben sollte. Insgesamt scheint MTMR7 also eine antidiabetische Funktion auszuüben, indirekt über die Förderung der PPAR γ -Aktivität und direkt über die Beeinflussung der AKT-Aktivität.

4.6 Offene Fragen

Bezüglich der Funktion der Phosphatase steht die genauere Charakterisierung der Phosphatase nach wie vor erst am Anfang. Es lässt sich zwar festhalten, dass das Myotubularin-verwandte Protein EGF- und Insulin-abhängige Kaskaden hemmt, das Zellwachstum kolorektaler Karzinomzelllinien verlangsamt, scheinbar ihre Suszeptibilität gegenüber gängigen Chemotherapeutika verstärkt und in einer bedeutenden Fraktion der Patienten mit kolorektalem Karzinom auf Proteinebene vermindert exprimiert wird oder verloren geht. Der Effekt scheint durch eine duale Hemmung der PI3K- und ERK-abhängigen Signaltransduktion vermittelt zu werden und zwar möglicherweise durch eine direkte Verminderung der Ras-Aktivität[200]. Der genaue Mechanismus, über den MTMR7 diese

¹⁴ Ob eine Erhöhung der im Standard-Serum enthaltenen Insulinkonzentration um 50ng/ml den hyperinsulinämischen Bedingungen in vivo nahe kommt sei dahingestellt. Ich habe mich bezüglich der Insulinkonzentration an den Arbeiten von Masur et al. und Tomas et al. orientiert.

¹⁵ Einschränkend ist einerseits anzumerken, dass es sich bei den analysierten Proben um Gewebelysate handelte, Aussagen über einzelne Zelltypen lassen sich also nur bedingt treffen. Des Weiteren wurden nur 2 Proben aus Muskelgewebe von nicht-db/db-Mäusen analysiert, sodass sich hier keinerlei valide Aussage treffen lässt.

¹⁶ Wobei selbstverständlich die subjektive Einschätzung der Färbeintensität in der Immunhistochemie einen relevanten Fehlerfaktor darstellt.

Effekte vermittelt lässt sich auf Grundlage der vorliegenden Daten nicht abschließend beantworten. Drei Möglichkeiten bieten sich meiner Meinung nach an: 1. MTMR7 könnte über den Eingriff in die Phosphatidylinositol-Homöostase die genannten Signalkaskaden hemmen, was zu einer Steigerung der PPAR γ -Aktivität und somit zu einer vermehrten Expression von Ras-Inhibitoren und insgesamt verminderten Ras-Expression führt. 2. Die MTMR7-Effekte werden über die Interaktion mit anderen Proteinen vermittelt, beispielsweise könnte die MTMR7-PPAR γ -Interaktion zu einer verminderten Degradation des Kernrezeptors führen und somit die Aktivität des Kernrezeptors erhöhen. 3. Die MTMR7-vermittelte Regulation des zellulären HSP90-Gehalts hält das Aktivitätsniveau RTK-vermittelter Signalkaskaden in physiologischem Rahmen und hemmt so für die Karzinogenese relevante Mechanismen.

Alle drei Mechanismen scheinen möglich und angesichts der scheinbaren Bedeutung für die in zahlreichen Tumorentitäten relevante aberante Ras-Signaltransduktion kann ein genaueres Verständnis der MTMR7-Funktion unter Umständen neue Möglichkeiten der therapeutischen Beeinflussung des Wachstums Ras-mutierter Tumoren eröffnen.

Ungeklärt ist zum gegenwärtigen Zeitpunkt die Rolle der Phosphatase in der Karzinogenese, lässt sich doch anhand der vorliegenden *in vitro* Daten weder eine Aussage über den Zeitpunkt des MTMR7-Verlusts in der mehrschrittigen malignen Entartung und Metastasierung treffen noch ist es legitim auf Grundlage der vorliegenden immunhistochemischen Daten einen kausalen Zusammenhang zwischen MTMR7 und Malignität des Tumors¹⁷ herstellen. Zu diesem Zweck wäre zum einen ein *in vivo*-Modell in Form einer MTMR7-defizienten Maus beispielsweise auf Grundlage des APCmin- Modells vonnöten, mit dessen Hilfe ein Effekt auf Tumorstadium und Entstehung simuliert werden könnte. Zum anderen sollte der Mechanismus des MTMR7-Verlusts geklärt werden, um so Hinweise darauf zu erhalten, ob der vermutete tumorsuppressive Effekt auch *in vivo* von Bedeutung ist oder – angenommen dem MTMR7-Verlust läge eine LOH der gesamten 8p22-Region zu Grunde – in dem durch den Verlust von benachbarten tumorsuppressiven Faktoren wie beispielsweise TUSC3 überlagert wird.

Bezüglich der Rolle des MTMR7-Proteins im Rahmen der Stoffwechselregulation, insbesondere der Glucose- und Energiehomöostase, lässt sich zum gegenwärtigen Zeitpunkt lediglich mutmaßen, dass die Lipidphosphatase im physiologischen Setting einen Beitrag leistet die anabole Wirkung des Insulins einzudämmen und zwar über die Reduktion der AKT-mTORC-Signaltransduktion. Zukünftige Studien werden klären müssen, inwieweit die AKT-vermittelte Fusion GLUT4-beladener Vesikel und damit die intestinale Glukoseresorption bzw. Elimination aus dem Blut durch die MTMR7-Aktivität beeinflusst wird. Zu erwarten wäre eine erniedrigte GLUT4-Transporterdichte und damit ein verminderter Glucose-Influx, im Darm also eine verminderte Glucose-Aufnahme und damit eine antidiabetogene, in Muskulatur und Leber die entgegengesetzte, den Blutzuckerspiegel erhöhende Wirkung. Zusätzlich stellt sich die Frage, inwiefern die MTMR7-vermittelte Normalisierung des AKT-Aktivitätsniveaus einen Einfluss auf die von Baricevic et al. beschriebene Resistenz gegen Insulinresistenz und Insulin-vermittelte verminderte Chemosensitivität[177] hat.

Zusammenfassend lässt sich wohl festhalten, dass es sich bei MTMR7 um einen Tumorsuppressor an der Schnittstelle zwischen Metabolismus und Karzinogenese handelt, dessen Aktivität durch bereits verfügbare Medikamente manipuliert werden kann und dessen Rolle insbesondere durch weitere Untersuchungen *in vivo* eingehender charakterisiert werden sollte.

¹⁷ Ich beziehe mich hier auf die Assoziation zwischen MTMR7-Expression und Differenzierungsgrad.

5 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Ziel dieser Arbeit war es, durch die Charakterisierung der Phosphatase MTMR7 im Kontext des kolorektalen Karzinoms einen Beitrag zum besseren Verständnis der Rolle und Regulation des Kernrezeptors PPAR γ insbesondere vor dem Hintergrund maligner Erkrankungen zu leisten und so mögliche Ansatzpunkte zur Therapie von Malignomen mit aktivierenden Mutationen der Ras-abhängigen Signalkaskaden zu liefern.

Es gelang die Erweiterung des bekannten Gewebsexpressionsmusters der Phosphatase sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene. Über die Analyse des Phosphorylierungsstatus` von Faktoren der MAPK- und PI3K-abhängigen Signalkaskaden konnte MTMR7 als Inhibitor beider identifiziert und die inhibitorische Wirkung auf die Signalebene des Ras-Proteins eingegrenzt werden. Diese Funktion kann als ursächlich für das verminderte Zellwachstum der kolorektalen Karzinom-Zelllinien mit MTMR7-Überexpression angesehen werden. Einen bedeutsamen Einfluss der Phosphatase auf die Sensitivität der Zellen gegenüber den Chemotherapeutika 5-FU und Cisplatin ließ sich nicht nachweisen, die Experimente mit dem mTORC-Inhibitor Everolimus bestätigen jedoch die molekularbiologischen Ergebnisse auf Ebene des Phänotyps: Die MTMR7-Überexpression führt zu einer Verminderung der mTORC-Aktivität. Die hier nachgewiesene Hemmung der ERK-Aktivierung sowohl nach EGF- als auch nach Rosiglitazon-Gabe ebenso wie die Beeinflussung des zellulären HSP90-Gehalts machte eine Förderung der genomischen Aktivität des Kernrezeptors wahrscheinlich, die durch Michaela Söhn [200] bestätigt werden konnte. Aufgrund der zentralen Rolle des Kernrezeptors PPAR γ in der Fett- und Glukosehomöostase und der Beeinflussung der PI3K-vermittelten anabolen und Proliferation-fördernden Effekte des Hormons Insulin war eine funktionelle Verknüpfung der Phosphatase MTMR7 mit eben diesen Aspekten naheliegend. Tatsächlich war das Niveau der MTMR7-mRNA-Expression in Hirn- und Darm-Gewebe abhängig vom metabolischen Status der Versuchstiere und proportional zum Grad der Insulinresistenz. Die mit EGF unternommenen Versuche bezüglich der AKT, S6 und ERK1/2-Aktivierung ließen sich mit Insulin als Aktivator der entsprechenden Signalkaskaden reproduzieren. Das Zellwachstum unter hyperinsulinämischen Bedingungen war durch MTMR7-Überexpression signifikant vermindert. Der immunhistochemische Nachweis von MTMR7 in etwa 50% der Proben humaner, kolorektaler Karzinome unterstreicht einerseits die Bedeutung der Phosphatase für die Tumorbilogie, scheint doch ein signifikanter Anteil der Tumore von einem MTMR7-Verlust auf Proteinebene zu profitieren. Andererseits macht der MTMR7-Nachweis in etwa der Hälfte der untersuchten Proben, unabhängig vom KRAS-Mutationsstatus, die Phosphatase zu einem möglichen Angriffspunkt insbesondere in der Therapie von Karzinomen mit aktivierenden Mutationen der Ras- und PI3K-vermittelten Signalkaskaden. Die eingangs beschriebene Komplexbildung der Phosphatase sowohl mit dem Kernrezeptor PPAR γ als auch mit anderen Myotubularinen stellt hier einen möglichen Angriffspunkt dar. Tatsächlich können die MTMR7-vermittelten Effekte durch Rosiglitazone verstärkt werden, was auf eine vermehrte Bildung von MTMR7/PPAR γ -Komplexen zurückgeführt werden kann[115,200]. Ein weiterer Therapieansatz könnte die Imitation der Komplexbildung mit einem der Coiled-Coil-Domäne kongruentem Peptid darstellen, der die Interaktion zwischen MTMR7 und MTMR9 imitiert. Die Identifikation der Hyperinsulinämie und des IGF2-LOIs als Risikofaktoren für den MTMR7-Protein-Expressionsverlust macht diese beiden Aspekte hierbei zu prädiktiven Faktoren für ein Ansprechen auf eine etwaige, zukünftige zielgerichtete Tumorthherapie mit dem Angriffspunkt MTMR7.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- 1 TCGA: Cross-cancer alteration summary for mtmr7 (105 studies / 1 gene), 2015, 2015,
- 2 Gaber E: Sterblichkeit, todesursachen und regionale unterschiede. Gesundheitsberichterstattung des Bundes.
- 3 Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Cernaj J, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Krieghoff-Henning E, Kunz B, Penzkofer A, Tremel K, Wittenberg K: Krebs in deutschland 2009/2010; in Robert Koch-Institut, e.V. GdeKiD (eds). Berlin, 2013,
- 4 Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M: Body-mass index and incidence of cancer: A systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 2008;371:569-578.
- 5 Longo DL, Harrison TR: Harrison's principles of internal medicine, ed 18th. New York, McGraw-Hill, 2012.
- 6 Burgermeister E, Seger R: Mapk kinases as nucleo-cytoplasmic shuttles for ppargamma. *Cell Cycle* 2007;6:1539-1548.
- 7 Peters JM, Shah YM, Gonzalez FJ: The role of peroxisome proliferator-activated receptors in carcinogenesis and chemoprevention. *Nat Rev Cancer* 2012;12:181-195.
- 8 Luconi M, Cantini G, Serio M: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (pparγ): Is the genomic activity the only answer? *Steroids* 2010;75:585-594.
- 9 Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, Simes RJ, Chalchal H, Shapiro JD, Robitaille S, Price TJ, Shepherd L, Au HJ, Langer C, Moore MJ, Zalberg JR: K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1757-1765.
- 10 Karapetis CS, Jonker D, Daneshmand M, Hanson JE, O'Callaghan CJ, Marginean C, Zalberg JR, Simes J, Moore MJ, Tebbutt NC, Price TJ, Shapiro JD, Pavlakis N, Gibbs P, Van Hazel GA, Lee U, Haq R, Virk S, Tu D, Lorimer IA: Pk3ca, braf, and pten status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer--results from ncic ctg/agitg co.17. *Clin Cancer Res* 2014;20:744-753.
- 11 Michalik L, Desvergne B, Wahli W: Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: Complex stories. *Nature Reviews Cancer* 2004;4:61-70.
- 12 Tencer L, Burgermeister E, Ebert MP, Liscovitch M: Rosiglitazone induces caveolin-1 by ppargamma-dependent and ppre-independent mechanisms: The role of egf receptor signaling and its effect on cancer cell drug resistance. *Anticancer Res* 2008;28:895-906.
- 13 Burgermeister E, Tencer L, Liscovitch M: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma upregulates caveolin-1 and caveolin-2 expression in human carcinoma cells. *Oncogene* 2003;22:3888-3900.
- 14 Burgermeister E, Liscovitch M, Rocken C, Schmid RM, Ebert MP: Caveats of caveolin-1 in cancer progression. *Cancer Lett* 2008;268:187-201.
- 15 Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D: Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer* 2009;9:489-499.
- 16 Robbins SL, Kumar V: Robbins and cotran pathologic basis of disease, ed 8th. Philadelphia, PA, Saunders/Elsevier, 2010.
- 17 Walther A, Houlston R, Tomlinson I: Association between chromosomal instability and prognosis in colorectal cancer: A meta-analysis. *Gut* 2008;57:941-950.
- 18 Gaiser T, Meinhardt S, Hirsch D, Killian JK, Gaedcke J, Jo P, Ponsa I, Miró R, Rüschoff J, Seitz G, Hu Y, Camps J, Ried T: Molecular patterns in the evolution of serrated lesion of the colorectum. *International Journal of Cancer* 2013;132:1800-1810.
- 19 Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Meyerhardt JA, Loda M, Giovannucci EL, Fuchs CS: CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, braf mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut* 2009;58:90-96.
- 20 Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass J, Haile R, Laird PW: CpG island methylator phenotype underlies sporadic

microsatellite instability and is tightly associated with braf mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 2006;38:787-793.

21 Popat S, Hubner R, Houlston RS: Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005;23:609-618.

22 Logan CY, Nusse R: The wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2004;20:781-810.

23 Thorstensen L, Lind GE, Lovig T, Diep CB, Meling GI, Rognum TO, Lothe RA: Genetic and epigenetic changes of components affecting the wnt pathway in colorectal carcinomas stratified by microsatellite instability. *Neoplasia* 2005;7:99-108.

24 Segditsas S, Tomlinson I: Colorectal cancer and genetic alterations in the wnt pathway. *Oncogene* 2006;25:7531-7537.

25 Takai D, Jones PA: Comprehensive analysis of cpg islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:3740-3745.

26 Ahuja N, Li Q, Mohan AL, Baylin SB, Issa JP: Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Res* 1998;58:5489-5494.

27 Issa JP: Cpg island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004;4:988-993.

28 Curtin K, Slattery ML, Samowitz WS: Cpg island methylation in colorectal cancer: Past, present and future. *Patholog Res Int* 2011;2011:902674.

29 Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JP: Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:18654-18659.

30 Cheng YW, Pincas H, Bacolod MD, Schemmann G, Giardina SF, Huang J, Barral S, Idrees K, Khan SA, Zeng Z, Rosenberg S, Notterman DA, Ott J, Paty P, Barany F: Cpg island methylator phenotype associates with low-degree chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:6005-6013.

31 O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amoroso M, Farraye FA: Comparison of microsatellite instability, cpg island methylation phenotype, braf and kras status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 2006;30:1491-1501.

32 Kakar S, Deng G, Cun L, Sahai V, Kim YS: Cpg island methylation is frequently present in tubulovillous and villous adenomas and correlates with size, site, and villous component. *Hum Pathol* 2008;39:30-36.

33 Jass JR: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 2007;50:113-130.

34 Snover DC: Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Human Pathology* 2011;42:1-10.

35 Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O, O'Brien MJ: Braf and kras mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: Relationship to histology and cpg island methylation status. *Am J Surg Pathol* 2004;28:1452-1459.

36 Saridaki Z, Souglakos J, Georgoulas V: Prognostic and predictive significance of msi in stages ii/iii colon cancer. *World J Gastroenterol* 2014;20:6809-6814.

37 Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003;349:247-257.

38 Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, Nordlinger B, van de Velde CJ, Balmana J, Regula J, Nagtegaal ID, Beets-Tan RG, Arnold D, Ciardiello F, Hoff P, Kerr D, Kohne CH, Labianca R, Price T, Scheithauer W, Sobrero A, Tabernero J, Aderka D, Barroso S, Bodoky G, Douillard JY, El Ghazaly H, Gallardo J, Garin A, Glynne-Jones R, Jordan K, Meshcheryakov A, Papamichail D, Pfeiffer P, Souglakos I, Turhal S, Cervantes A: Esmo consensus guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. A personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol* 2012;23:2479-2516.

- 39 Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA: Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: The multicenter "rascal" study. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:675-684.
- 40 Pylayeva-Gupta Y, Grabocka E, Bar-Sagi D: Ras oncogenes: Weaving a tumorigenic web. *Nature Reviews Cancer* 2011;11:761-774.
- 41 Downward J: Targeting ras signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3:11-22.
- 42 De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S, Lamba S, Arena S, Frattini M, Piessevaux H, Van Cutsem E, O'Callaghan CJ, Khambata-Ford S, Zalberg JR, Simes J, Karapetis CS, Bardelli A, Tejpar S: Association of kras p.G13d mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 2010;304:1812-1820.
- 43 Keohavong P, DeMichele MA, Melacrinis AC, Landreneau RJ, Weyant RJ, Siegfried JM: Detection of k-ras mutations in lung carcinomas: Relationship to prognosis. *Clin Cancer Res* 1996;2:411-418.
- 44 Schupp M, Lazar MA: Endogenous ligands for nuclear receptors: Digging deeper. *J Biol Chem* 2010;285:40409-40415.
- 45 Wright MB, Bortolini M, Tadayyon M, Bopst M: Minireview: Challenges and opportunities in development of ppar agonists. *Mol Endocrinol* 2014;me20131427.
- 46 Berger J, Moller DE: The mechanisms of action of ppar. *Annu Rev Med* 2002;53:409-435.
- 47 Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, Lundberg E, Jonasson K, Forsberg M, Zwahlen M, Kampf C, Wester K, Hober S, Wernerus H, Bjorling L, Ponten F: Towards a knowledge-based human protein atlas. *Nat Biotechnol* 2010;28:1248-1250.
- 48 Girroir EE, Hollingshead HE, He P, Zhu B, Perdew GH, Peters JM: Quantitative expression patterns of peroxisome proliferator-activated receptor-beta/delta (pparbeta/delta) protein in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;371:456-461.
- 49 Sprecher DL, Massien C, Pearce G, Billin AN, Perlstein I, Willson TM, Hassall DG, Ancellin N, Patterson SD, Lobe DC, Johnson TG: Triglyceride:High-density lipoprotein cholesterol effects in healthy subjects administered a peroxisome proliferator activated receptor delta agonist. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:359-365.
- 50 Grygiel-Gorniak B: Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: Nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J* 2014;13:17.
- 51 Medina-Gomez G, Gray S, Vidal-Puig A: Adipogenesis and lipotoxicity: Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppargamma) and ppargammacoactivator-1 (pgc1). *Public Health Nutr* 2007;10:1132-1137.
- 52 Ahmadian M, Suh JM, Hah N, Liddle C, Atkins AR, Downes M, Evans RM: Ppar signaling and metabolism: The good, the bad and the future. *Nature Medicine* 2013;99:557-566.
- 53 Hotamisligil GS, Peraldi P, Budavari A, Ellis R, White MF, Spiegelman BM: Irs-1-mediated inhibition of insulin receptor tyrosine kinase activity in tnf-alpha- and obesity-induced insulin resistance. *Science* 1996;271:665-668.
- 54 Gregor MF, Hotamisligil GS: Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* 2011;29:415-445.
- 55 Prieur X, Mok CY, Velagapudi VR, Nunez V, Fuentes L, Montaner D, Ishikawa K, Camacho A, Barbarroja N, O'Rahilly S, Sethi JK, Dopazo J, Oresic M, Ricote M, Vidal-Puig A: Differential lipid partitioning between adipocytes and tissue macrophages modulates macrophage lipotoxicity and m2/m1 polarization in obese mice. *Diabetes* 2011;60:797-809.
- 56 Sauer S: Ligands for the nuclear peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Trends Pharmacol Sci* 2015;36:688-704.
- 57 Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F: Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436-444.
- 58 Huang JW, Shiau CW, Yang YT, Kulp SK, Chen KF, Brueggemeier RW, Shapiro CL, Chen CS: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-independent ablation of cyclin d1 by thiazolidinediones and their derivatives in breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 2005;67:1342-1348.

- 59 Koga H, Sakisaka S, Harada M, Takagi T, Hanada S, Taniguchi E, Kawaguchi T, Sasatomi K, Kimura R, Hashimoto O, Ueno T, Yano H, Kojiro M, Sata M: Involvement of p21(waf1/cip1), p27(kip1), and p18(ink4c) in troglitazone-induced cell-cycle arrest in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 2001;33:1087-1097.
- 60 Sharma C, Pradeep A, Wong L, Rana A, Rana B: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation can regulate beta-catenin levels via a proteasome-mediated and adenomatous polyposis coli-independent pathway. *J Biol Chem* 2004;279:35583-35594.
- 61 Zander T, Kraus JA, Grommes C, Schlegel U, Feinstein D, Klockgether T, Landreth G, Koenigsknecht J, Heneka MT: Induction of apoptosis in human and rat glioma by agonists of the nuclear receptor ppargamma. *J Neurochem* 2002;81:1052-1060.
- 62 Shiau CW, Yang CC, Kulp SK, Chen KF, Chen CS, Huang JW, Chen CS: Thiazolidinediones mediate apoptosis in prostate cancer cells in part through inhibition of bcl-xl/bcl-2 functions independently of ppargamma. *Cancer Res* 2005;65:1561-1569.
- 63 McAlpine CA, Barak Y, Matise I, Cormier RT: Intestinal-specific ppargamma deficiency enhances tumorigenesis in apcmin/+ mice. *Int J Cancer* 2006;119:2339-2346.
- 64 Friedrich T, Richter B, Gaiser T, Weiss C, Janssen KP, Einwachter H, Schmid RM, Ebert MPA, Burgermeister E: Deficiency of caveolin-1 in apcmin/+ mice promotes colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 2013;34:2109-2118.
- 65 Ogino S, Shima K, Baba Y, Nosho K, Irahara N, Kure S, Chen L, Toyoda S, Kirkner GJ, Wang YL, Giovannucci EL, Fuchs CS: Colorectal cancer expression of peroxisome proliferator-activated receptor γ (pparg, ppargamma) is associated with good prognosis. *Gastroenterology* 2009;136:1242-1250.
- 66 Grommes C, Landreth GE, Heneka MT: Antineoplastic effects of peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *Lancet Oncol* 2004;5:419-429.
- 67 Lowell BB: Ppargamma: An essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 1999;99:239-242.
- 68 Cariou B, Charbonnel B, Staels B: Thiazolidinediones and ppar γ agonists: Time for a reassessment. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 2012;23:205-215.
- 69 Hallenborg P, Jorgensen C, Petersen RK, Feddersen S, Araujo P, Markt P, Langer T, Furstenberger G, Krieg P, Koppen A, Kalkhoven E, Madsen L, Kristiansen K: Epidermis-type lipoxygenase 3 regulates adipocyte differentiation and peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity. *Mol Cell Biol* 2010;30:4077-4091.
- 70 Waku T, Shiraki T, Oyama T, Maebara K, Nakamori R, Morikawa K: The nuclear receptor ppargamma individually responds to serotonin- and fatty acid-metabolites. *EMBO J* 2010;29:3395-3407.
- 71 Aviello G, Romano B, Borrelli F, Capasso R, Gallo L, Piscitelli F, Di Marzo V, Izzo AA: Chemopreventive effect of the non-psychotropic phytocannabinoid cannabidiol on experimental colon cancer. *J Mol Med (Berl)* 2012;90:925-934.
- 72 Scuderi C, Steardo L, Esposito G: Cannabidiol promotes amyloid precursor protein ubiquitination and reduction of beta amyloid expression in shsy5yapp+ cells through ppargamma involvement. *Phytother Res* 2014;28:1007-1013.
- 73 Galve-Roperh I, Chiurchiu V, Diaz-Alonso J, Bari M, Guzman M, Maccarrone M: Cannabinoid receptor signaling in progenitor/stem cell proliferation and differentiation. *Prog Lipid Res* 2013;52:633-650.
- 74 Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA: Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-pgj2 and the ligation of ppargamma. *J Clin Invest* 2003;112:945-955.
- 75 Ray DM, Akbiyik F, Phipps RP: The peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppargamma) ligands 15-deoxy-delta12,14-prostaglandin j2 and ciglitazone induce human b lymphocyte and b cell lymphoma apoptosis by ppargamma-independent mechanisms. *J Immunol* 2006;177:5068-5076.
- 76 Niemoeller OM, Mahmud H, Foller M, Wieder T, Lang F: Ciglitazone and 15d-pgj2 induced suicidal erythrocyte death. *Cell Physiol Biochem* 2008;22:237-244.

- 77 Cheung KJ, Tzamelis I, Pissios P, Rovira I, Gavrillova O, Ohtsubo T, Chen Z, Finkel T, Flier JS, Friedman JM: Xanthine oxidoreductase is a regulator of adipogenesis and ppar γ activity. *Cell Metab* 2007;5:115-128.
- 78 Schupp M, Lefterova MI, Janke J, Leitner K, Cristancho AG, Mullican SE, Qatanani M, Szwegold N, Steger DJ, Curtin JC, Kim RJ, Suh MJ, Albert MR, Engeli S, Gudas LJ, Lazar MA: Retinol saturase promotes adipogenesis and is downregulated in obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:1105-1110.
- 79 Sugawara K, Olson TS, Moskaluk CA, Stevens BK, Hoang S, Kozaiwa K, Cominelli F, Ley KF, McDuffie M: Linkage to peroxisome proliferator-activated receptor- γ in samp1/yitfc mice and in human crohn's disease. *Gastroenterology* 2005;128:351-360.
- 80 Mohapatra SK, Guri AJ, Climent M, Vives C, Carbo A, Horne WT, Hontecillas R, Bassaganya-Riera J: Immunoregulatory actions of epithelial cell ppar γ at the colonic mucosa of mice with experimental inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* 2010;5:e10215.
- 81 Tsukahara T, Tsukahara R, Fujiwara Y, Yue J, Cheng Y, Guo H, Bolen A, Zhang C, Balazs L, Re F, Du G, Frohman MA, Baker DL, Parrill AL, Uchiyama A, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tigyi G: Phospholipase d2-dependent inhibition of the nuclear hormone receptor ppar γ by cyclic phosphatidic acid. *Mol Cell* 2010;39:421-432.
- 82 Tobin JF, Freedman LP: Nuclear receptors as drug targets in metabolic diseases: New approaches to therapy. *Trends Endocrinol Metab* 2006;17:284-290.
- 83 Doshi LS, Brahma MK, Bahirat UA, Dixit AV, Nemmani KV: Discovery and development of selective ppar γ modulators as safe and effective antidiabetic agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2010;19:489-512.
- 84 Bruning JB, Chalmers MJ, Prasad S, Busby SA, Kamenecka TM, He Y, Nettles KW, Griffin PR: Partial agonists activate ppar γ using a helix 12 independent mechanism. *Structure* 2007;15:1258-1271.
- 85 Rousseaux C, Lefebvre B, Dubuquoy L, Lefebvre P, Romano O, Auwerx J, Metzger D, Wahli W, Desvergne B, Naccari GC, Chavatte P, Farce A, Bulois P, Cortot A, Colombel JF, Desreumaux P: Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor- γ . *J Exp Med* 2005;201:1205-1215.
- 86 Schupp M, Clemenz M, Gineste R, Witt H, Janke J, Helleboid S, Hennuyer N, Ruiz P, Unger T, Staels B, Kintscher U: Molecular characterization of new selective peroxisome proliferator-activated receptor γ modulators with angiotensin receptor blocking activity. *Diabetes* 2005;54:3442-3452.
- 87 Jaeschke H: Troglitazone hepatotoxicity: Are we getting closer to understanding idiosyncratic liver injury? *Toxicol Sci* 2007;97:1-3.
- 88 Nissen SE, Wolski K: Effect of rosiglitazone on the risk of myocardial infarction and death from cardiovascular causes. *N Engl J Med* 2007;356:2457-2471.
- 89 Zhang H, Zhang A, Kohan DE, Nelson RD, Gonzalez FJ, Yang T: Collecting duct-specific deletion of peroxisome proliferator-activated receptor γ blocks thiazolidinedione-induced fluid retention. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:9406-9411.
- 90 Erdmann E, Charbonnel B, Wilcox RG, Skene AM, Massi-Benedetti M, Yates J, Tan M, Spanheimer R, Standl E, Dormandy JA: Pioglitazone use and heart failure in patients with type 2 diabetes and preexisting cardiovascular disease: Data from the proactive study (proactive 08). *Diabetes Care* 2007;30:2773-2778.
- 91 Ryan KK, Li B, Grayson BE, Matter EK, Woods SC, Seeley RJ: A role for central nervous system ppar- γ in the regulation of energy balance. *Nat Med* 2011;17:623-626.
- 92 Lu M, Sarruf DA, Talukdar S, Sharma S, Li P, Bandyopadhyay G, Nalbandian S, Fan W, Gayen JR, Mahata SK, Webster NJ, Schwartz MW, Olefsky JM: Brain ppar- γ promotes obesity and is required for the insulin-sensitizing effect of thiazolidinediones. *Nat Med* 2011;17:618-622.
- 93 Basu A, Jensen MD, McCann F, Mukhopadhyay D, Joyner MJ, Rizza RA: Effects of pioglitazone versus glipizide on body fat distribution, body water content, and hemodynamics in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006;29:510-514.

- 94 Mieczkowska A, Basle MF, Chappard D, Mabileau G: Thiazolidinediones induce osteocyte apoptosis by a g protein-coupled receptor 40-dependent mechanism. *Journal of Biological Chemistry* 2012;287:23517-23526.
- 95 Lewis JD, Ferrara A, Peng T, Hedderson M, Bilker WB, Quesenberry CP, Jr., Vaughn DJ, Nessel L, Selby J, Strom BL: Risk of bladder cancer among diabetic patients treated with pioglitazone: Interim report of a longitudinal cohort study. *Diabetes Care* 2011;34:916-922.
- 96 Burgermeister E, Seger R: Ppar γ and mek interactions in cancer. *PPAR Research* 2008;2008:1-16.
- 97 Katsura S, Okumura T, Ito R, Sugawara A, Yokoyama A: Identification of posttranslational modifications in peroxisome proliferator-activated receptor gamma using mass spectrometry. *PPAR Res* 2014;2014:468925.
- 98 Ohshima T, Koga H, Shimotohno K: Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by sumo-1 modification. *J Biol Chem* 2004;279:29551-29557.
- 99 Floyd ZE, Stephens JM: Controlling a master switch of adipocyte development and insulin sensitivity: Covalent modifications of ppar γ . *Biochim Biophys Acta* 2012;1822:1090-1095.
- 100 Shibuya A, Wada K, Nakajima A, Saeki M, Katayama K, Mayumi T, Kadowaki T, Niwa H, Kamisaki Y: Nitration of ppar γ inhibits ligand-dependent translocation into the nucleus in a macrophage-like cell line, raw 264. *FEBS Lett* 2002;525:43-47.
- 101 Qiang L, Wang L, Kon N, Zhao W, Lee S, Zhang Y, Rosenbaum M, Zhao Y, Gu W, Farmer SR, Accili D: Brown remodeling of white adipose tissue by sirt1-dependent deacetylation of ppar γ . *Cell* 2012;150:620-632.
- 102 Hauser S, Adelmant G, Sarraf P, Wright HM, Mueller E, Spiegelman BM: Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation. *J Biol Chem* 2000;275:18527-18533.
- 103 Waite KJ, Floyd ZE, Arbour-Reily P, Stephens JM: Interferon-gamma-induced regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and stats in adipocytes. *J Biol Chem* 2001;276:7062-7068.
- 104 Wheeler MC, Gekakis N: Hsp90 modulates ppar γ activity in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease. *J Lipid Res* 2014
- 105 van Beekum O, Fleskens V, Kalkhoven E: Posttranslational modifications of ppar-gamma: Fine-tuning the metabolic master regulator. *Obesity (Silver Spring)* 2009;17:213-219.
- 106 Burns KA, Vanden Heuvel JP: Modulation of ppar activity via phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2007;1771:952-960.
- 107 Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA: Interdomain communication regulating ligand binding by ppar-gamma. *Nature* 1998;396:377-380.
- 108 Whitehead JP: Diabetes: New conductors for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (ppar γ) orchestra. *Int J Biochem Cell Biol* 2011;43:1071-1074.
- 109 Lee HY, Jung H, Jang IH, Suh PG, Ryu SH: Cdk5 phosphorylates pld2 to mediate egf-dependent insulin secretion. *Cell Signal* 2008;20:1787-1794.
- 110 Nomura S, Nakajima A, Ishimine S, Matsuhashi N, Kadowaki T, Kaminishi M: Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor in histologically different human gastric cancer tissues. *J Exp Clin Cancer Res* 2006;25:443-448.
- 111 Kim HJ, Hwang JY, Kim HJ, Choi WS, Lee JH, Kim HJ, Chang KC, Nishinaka T, Yabe-Nishimura C, Seo HG: Expression of a peroxisome proliferator-activated receptor gamma 1 splice variant that was identified in human lung cancers suppresses cell death induced by cisplatin and oxidative stress. *Clin Cancer Res* 2007;13:2577-2583.
- 112 Papadaki I, Mylona E, Giannopoulou I, Markaki S, Keramopoulos A, Nakopoulou L: Ppar γ expression in breast cancer: Clinical value and correlation with erb β . *Histopathology* 2005;46:37-42.
- 113 Burgermeister E, Chuderland D, Hanoch T, Meyer M, Liscovitch M, Seger R: Interaction with mek causes nuclear export and downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 2007;27:803-817.
- 114 Cathomas G: Pik3ca in colorectal cancer. *Frontiers in Oncology* 2014;4

- 115 Friedrich T: (naturwissenschaftliche) dissertation. Ebert SFB 824-TP B1, DFG; Burgermeister #108287, DKH
- 116 Rassow J: Biochemie ... 50 tabellen, ed 2., aktualisierte Aufl. Stuttgart, Thieme
- 117 Bunney TD, Katan M: Phosphoinositide signalling in cancer: Beyond pi3k and pten. *Nat Rev Cancer* 2010;10:342-352.
- 118 Deming DA, Leystra AA, Nettekoven L, Sievers C, Miller D, Middlebrooks M, Clipson L, Albrecht D, Bacher J, Washington MK, Weichert J, Halberg RB: Pik3ca and apc mutations are synergistic in the development of intestinal cancers. *Oncogene* 2014;33:2245-2254.
- 119 Cully M, You H, Levine AJ, Mak TW: Beyond pten mutations: The pi3k pathway as an integrator of multiple inputs during tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer* 2006;6:184-192.
- 120 Jean S, Kiger AA: Classes of phosphoinositide 3-kinases at a glance. *Journal of Cell Science* 2014;127:923-928.
- 121 Castellano E, Downward J: Ras interaction with pi3k: More than just another effector pathway. *Genes Cancer* 2011;2:261-274.
- 122 Schlessinger J: Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of egf receptor. *Cell* 2002;110:669-672.
- 123 Pacold ME, Suire S, Perisic O, Lara-Gonzalez S, Davis CT, Walker EH, Hawkins PT, Stephens L, Eccleston JF, Williams RL: Crystal structure and functional analysis of ras binding to its effector phosphoinositide 3-kinase gamma. *Cell* 2000;103:931-943.
- 124 Velho S, Oliveira C, Ferreira A, Ferreira AC, Suriano G, Schwartz S, Jr., Duval A, Carneiro F, Machado JC, Hamelin R, Seruca R: The prevalence of pik3ca mutations in gastric and colon cancer. *European journal of cancer* 2005;41:1649-1654.
- 125 Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA: Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis* 2013;2:e71.
- 126 Stokoe D, Stephens LR, Copeland T, Gaffney PR, Reese CB, Painter GF, Holmes AB, McCormick F, Hawkins PT: Dual role of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate in the activation of protein kinase b. *Science* 1997;277:567-570.
- 127 Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM: Phosphorylation and regulation of akt/pkb by the rictor-mtor complex. *Science* 2005;307:1098-1101.
- 128 Agarwal E, Brattain MG, Chowdhury S: Cell survival and metastasis regulation by akt signaling in colorectal cancer. *Cellular Signalling* 2013;25:1711-1719.
- 129 Balla T, Wymann M, York JD: Phosphoinositides i enzymes of synthesis and degradation: *Subcellular biochemistry*,. Dordrecht ; New York, Springer, 2012, pp 1 online resource (xv, 352 p.).
- 130 Brozinick JT, Jr., Roberts BR, Dohm GL: Defective signaling through akt-2 and -3 but not akt-1 in insulin-resistant human skeletal muscle: Potential role in insulin resistance. *Diabetes* 2003;52:935-941.
- 131 Lorenzo O: Systematic analysis of myotubularins: Heteromeric interactions, subcellular localisation and endosomelated functions. *Journal of Cell Science* 2006;119:2953-2959.
- 132 Robinson FL, Dixon JE: Myotubularin phosphatases: Policing 3-phosphoinositides. *Trends in Cell Biology* 2006;16:403-412.
- 133 Hnia K, Vaccari I, Bolino A, Laporte J: Myotubularin phosphoinositide phosphatases: Cellular functions and disease pathophysiology. *Trends Mol Med* 2012;18:317-327.
- 134 Begley MJ, Dixon JE: The structure and regulation of myotubularin phosphatases. *Current Opinion in Structural Biology* 2005;15:614-620.
- 135 Berger P, Schaffitzel C, Berger I, Ban N, Suter U: Membrane association of myotubularin-related protein 2 is mediated by a pleckstrin homology-gram domain and a coiled-coil dimerization module. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:12177-12182.
- 136 Mochizuki Y, Majerus PW: Characterization of myotubularin-related protein 7 and its binding partner, myotubularin-related protein 9. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003;100:9768-9773.

- 137 Cao C, Backer JM, Laporte J, Bedrick EJ, Wandinger-Ness A: Sequential actions of myotubularin lipid phosphatases regulate endosomal pi(3)p and growth factor receptor trafficking. *Molecular Biology of the Cell* 2008;19:3334-3346.
- 138 Kerk D, Moorhead GB: A phylogenetic survey of myotubularin genes of eukaryotes: Distribution, protein structure, evolution, and gene expression. *BMC Evol Biol* 2010;10:196.
- 139 Zou J, Chang SC, Marjanovic J, Majerus PW: Mtmr9 increases mtmr6 enzyme activity, stability, and role in apoptosis. *Journal of Biological Chemistry* 2008;284:2064-2071.
- 140 Santarpia L, Iwamoto T, Di Leo A, Hayashi N, Bottai G, Stampfer M, Andre F, Turner NC, Symmans WF, Hortobagyi GN, Puzsai L, Bianchini G: DNA repair gene patterns as prognostic and predictive factors in molecular breast cancer subtypes. *Oncologist* 2013;18:1063-1073.
- 141 Maekawa M, Terasaka S, Mochizuki Y, Kawai K, Ikeda Y, Araki N, Skolnik EY, Taguchi T, Arai H: Sequential breakdown of 3-phosphorylated phosphoinositides is essential for the completion of macropinocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014;111:E978-E987.
- 142 Fetalvero KM, Yu Y, Goetschkes M, Liang G, Valdez RA, Gould T, Triantafellow E, Bergling S, Loureiro J, Eash J, Lin V, Porter JA, Finan PM, Walsh K, Yang Y, Mao X, Murphy LO: Defective autophagy and mtorc1 signaling in myotubularin null mice. *Molecular and Cellular Biology* 2012;33:98-110.
- 143 Zou J, Zhang C, Marjanovic J, Kisseleva MV, Majerus PW, Wilson MP: Myotubularin-related protein (mtmr) 9 determines the enzymatic activity, substrate specificity, and role in autophagy of mtmr8. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2012;109:9539-9544.
- 144 Clague MJ, Lorenzo O: The myotubularin family of lipid phosphatases. *Traffic* 2005;6:1063-1069.
- 145 Shen J, Yu WM, Brotto M, Scherman JA, Guo C, Stoddard C, Nosek TM, Valdivia HH, Qu CK: Deficiency of mip/mtmr14 phosphatase induces a muscle disorder by disrupting ca(2+) homeostasis. *Nat Cell Biol* 2009;11:769-776.
- 146 Srivastava S, Li Z, Lin L, Liu G, Ko K, Coetzee WA, Skolnik EY: The phosphatidylinositol 3-phosphate phosphatase myotubularin-related protein 6 (mtmr6) is a negative regulator of the ca2+-activated k+ channel kca3.1. *Mol Cell Biol* 2005;25:3630-3638.
- 147 Razidlo GL, Katafiasz D, Taylor GS: Myotubularin regulates akt-dependent survival signaling via phosphatidylinositol 3-phosphate. *Journal of Biological Chemistry* 2011;286:20005-20019.
- 148 Vergne I, Deretic V: The role of pi3p phosphatases in the regulation of autophagy. *FEBS Lett*;584:1313-1318.
- 149 MacKeigan JP, Murphy LO, Blenis J: Sensitized rna screen of human kinases and phosphatases identifies new regulators of apoptosis and chemoresistance. *Nat Cell Biol* 2005;7:591-600.
- 150 Tsujita K, Itoh T, Ijuin T, Yamamoto A, Shisheva A, Laporte J, Takenawa T: Myotubularin regulates the function of the late endosome through the gram domain-phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate interaction. *J Biol Chem* 2004;279:13817-13824.
- 151 Franklin NE, Taylor GS, Vaccrasis PO: Endosomal targeting of the phosphoinositide 3-phosphatase mtmr2 is regulated by an n-terminal phosphorylation site. *J Biol Chem* 2011;286:15841-15853.
- 152 Yu J, Pan L, Qin X, Chen H, Xu Y, Chen Y, Tang H: Mtmr4 attenuates transforming growth factor beta (tgfbeta) signaling by dephosphorylating r-smads in endosomes. *J Biol Chem* 2010;285:8454-8462.
- 153 Yu J, He X, Chen YG, Hao Y, Yang S, Wang L, Pan L, Tang H: Myotubularin-related protein 4 (mtmr4) attenuates bmp/dpp signaling by dephosphorylation of smad proteins. *J Biol Chem* 2013;288:79-88.
- 154 Blagosklonny MV, Mei J, Li Z, Gui J-F: Cooperation of mtmr8 with pi3k regulates actin filament modeling and muscle development in zebrafish. *PLoS ONE* 2009;4:e4979.
- 155 Bolino A, Muglia M, Conforti FL, LeGuern E, Salih MA, Georgiou DM, Christodoulou K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Mandich P, Schenone A, Gambardella A, Bono F, Quattrone A, Devoto M, Monaco AP: Charcot-marie-tooth type 4b is caused by mutations in the gene encoding myotubularin-related protein-2. *Nat Genet* 2000;25:17-19.

- 156 Azzedine H, Bolino A, Taieb T, Birouk N, Di Duca M, Bouhouche A, Benamou S, Mrabet A, Hammadouche T, Chkili T, Gouider R, Ravazzolo R, Brice A, Laporte J, LeGuern E: Mutations in *mtmr13*, a new pseudophosphatase homologue of *mtmr2* and *sbf1*, in two families with an autosomal recessive demyelinating form of charcot-marie-tooth disease associated with early-onset glaucoma. *Am J Hum Genet* 2003;72:1141-1153.
- 157 Yoo YD, Cho SM, Kim JS, Chang YS, Ahn CM, Kim HJ: The human myotubularin-related protein suppresses the growth of lung carcinoma cells. *Oncol Rep* 2004;12:667-671.
- 158 Zheng B, Yu X, Chai R: Myotubularin-related phosphatase 3 promotes growth of colorectal cancer cells. *ScientificWorldJournal* 2014;2014:703804.
- 159 Kim SA, Taylor GS, Torgersen KM, Dixon JE: Myotubularin and *mtmr2*, phosphatidylinositol 3-phosphatases mutated in myotubular myopathy and type 4b charcot-marie-tooth disease. *J Biol Chem* 2002;277:4526-4531.
- 160 Sanchez-Juan P, Bishop MT, Aulchenko YS, Brandel JP, Rivadeneira F, Struchalin M, Lambert JC, Amouyel P, Combarros O, Sainz J, Carracedo A, Uitterlinden AG, Hofman A, Zerr I, Kretzschmar HA, Laplanche JL, Knight RS, Will RG, van Duijn CM: Genome-wide study links *mtmr7* gene to variant creutzfeldt-jakob risk. *Neurobiol Aging*;33:1487 e1421-1488.
- 161 Chu PL, Keum S, Marchuk DA: A novel genetic locus modulates infarct volume independently of the extent of collateral circulation. *Physiol Genomics* 2013;45:751-763.
- 162 Guo L, Martens C, Bruno D, Porcella SF, Yamane H, Caucheteux SM, Zhu J, Paul WE: Lipid phosphatases identified by screening a mouse phosphatase shRNA library regulate t-cell differentiation and protein kinase b akt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2013;110:E1849-E1856.
- 163 Mochizuki Y, Ohashi R, Kawamura T, Iwanari H, Kodama T, Naito M, Hamakubo T: Phosphatidylinositol 3-phosphatase myotubularin-related protein 6 (*mtmr6*) is regulated by small gtpase *rab1b* in the early secretory and autophagic pathways. *J Biol Chem* 2013;288:1009-1021.
- 164 Silhankova M, Port F, Harterink M, Basler K, Korswagen HC: Wnt signalling requires *mtm-6* and *mtm-9* myotubularin lipid-phosphatase function in wnt-producing cells. *The EMBO Journal* 2010;29:4094-4105.
- 165 Tang L, Tong Y, Cao H, Xie S, Yang Q, Zhang F, Zhu Q, Huang L, Lu Q, Yang Y, Li D, Chen M, Yu C, Jin W, Yuan Y, Tong N: The *mtmr9* rs2293855 polymorphism is associated with glucose tolerance, insulin secretion, insulin sensitivity and increased risk of prediabetes. *Gene* 2014;546:150-155.
- 166 Yanagiya T, Tanabe A, Iida A, Saito S, Sekine A, Takahashi A, Tsunoda T, Kamohara S, Nakata Y, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Masuzaki H, Yoneda M, Nakajima A, Miyazaki S, Tokunaga K, Kawamoto M, Funahashi T, Hamaguchi K, Tanaka K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Yoshimatsu H, Nakao K, Sakata T, Matsuzawa Y, Kamatani N, Nakamura Y, Hotta K: Association of single-nucleotide polymorphisms in *mtmr9* gene with obesity. *Human Molecular Genetics* 2007;16:3017-3026.
- 167 Hotta K, Kitamoto T, Kitamoto A, Mizusawa S, Matsuo T, Nakata Y, Kamohara S, Miyatake N, Kotani K, Komatsu R, Itoh N, Mineo I, Wada J, Yoneda M, Nakajima A, Funahashi T, Miyazaki S, Tokunaga K, Masuzaki H, Ueno T, Hamaguchi K, Tanaka K, Yamada K, Hanafusa T, Oikawa S, Yoshimatsu H, Sakata T, Matsuzawa Y, Nakao K, Sekine A: Association of variations in the *fto*, *scg3* and *mtmr9* genes with metabolic syndrome in a japanese population. *J Hum Genet* 2011;56:647-651.
- 168 http://de.Wikipedia.Org/wiki/real_time_quantitative_pcr, 2014, 2014, pp Real Time Quantitative PCR.
- 169 Flatt PR, Bailey CJ, Hampton SM, Swanston-Flatt SK, Marks V: Immunoreactive c-peptide in spontaneous syndromes of obesity and diabetes in mice. *Horm Metab Res* 1987;19:1-5.
- 170 Thenen SW, Mayer J: Hyperinsulinemia and fat cell glycerokinase activity in obese (*ob/ob*) and diabetic (*db/db*) mice. *Horm Metab Res* 1976;8:80-81.
- 171 Weidner P, Söhn M, Gutting T, Friedrich T, Gaiser T, Magdeburg J, Kienle P, Ruh H, Hopf C, Behrens H-M, Röcken C, Hanoch T, Seger R, Ebert M, Burgermeister E: Myotubularin-related protein 7 inhibits insulin signaling in colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;Epub Date 07.07.2016

- 172 Gardner OS, Dewar BJ, Graves LM: Activation of mitogen-activated protein kinases by peroxisome proliferator-activated receptor ligands: An example of nongenomic signaling. *Mol Pharmacol* 2005;68:933-941.
- 173 Gras D, Chanez P, Urbach V, Vachier I, Godard P, Bonnans C: Thiazolidinediones induce proliferation of human bronchial epithelial cells through the gpr40 receptor. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009;296:L970-978.
- 174 Mieczkowska A, Basle MF, Chappard D, Mabileau G: Thiazolidinediones induce osteocyte apoptosis by a g protein-coupled receptor 40-dependent mechanism. *J Biol Chem* 2012;287:23517-23526.
- 175 Acquaviva J, He S, Sang J, Smith DL, Sequeira M, Zhang C, Bates RC, Proia DA: Mtor inhibition potentiates hsp90 inhibitor activity via cessation of hsp synthesis. *Molecular Cancer Research* 2014
- 176 Wishart MJ, Dixon JE: Pten and myotubularin phosphatases: From 3-phosphoinositide dephosphorylation to disease. *Trends Cell Biol* 2002;12:579-585.
- 177 Baricevic I, Roberts DL, Renehan AG: Chronic insulin exposure does not cause insulin resistance but is associated with chemo-resistance in colon cancer cells. *Horm Metab Res* 2014;46:85-93.
- 178 Masur K, Vetter C, Hinz A, Tomas N, Henrich H, Niggemann B, Zanker KS: Diabetogenic glucose and insulin concentrations modulate transcriptome and protein levels involved in tumour cell migration, adhesion and proliferation. *Br J Cancer* 2011;104:345-352.
- 179 Tomas NM, Masur K, Piecha JC, Niggemann B, Zanker KS: Akt and phospholipase cgamma are involved in the regulation of growth and migration of mda-mb-468 breast cancer and sw480 colon cancer cells when cultured with diabetogenic levels of glucose and insulin. *BMC Res Notes* 2012;5:214.
- 180 Marin JJG, Sanchez de Medina F, Castaño B, Bujanda L, Romero MR, Martinez-Augustin O, Moral-Avila RD, Briz O: Chemoprevention, chemotherapy, and chemoresistance in colorectal cancer. *Drug Metabolism Reviews* 2012;44:148-172.
- 181 Longley DB, Allen WL, Johnston PG: Drug resistance, predictive markers and pharmacogenomics in colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 2006;1766:184-196.
- 182 (NCI) NCI: Oxaliplatin, leucovorin calcium, and fluorouracil with or without bevacizumab in treating patients who have undergone surgery for stage ii colon cancer, 05.11.2014,
- 183 Bracht K, Nicholls AM, Liu Y, Bodmer WF: 5-fluorouracil response in a large panel of colorectal cancer cell lines is associated with mismatch repair deficiency. *Br J Cancer* 2010;103:340-346.
- 184 Mohseni M, Park BH: Pik3ca and kras mutations predict for response to everolimus therapy: Now that's rad001. *The Journal of clinical investigation* 2010;120:2655-2658.
- 185 Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N: Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cbiportal. *Sci Signal* 2013;6:pl1.
- 186 Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N: The cbio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012;2:401-404.
- 187 TCGA: Liver hepatocellular carcinoma (tcga, provisional) overall survival kaplan-meier estimate, 2015, 2015,
- 188 Banerjee C, Khatri P, Raman R, Bhatia H, Datta M, Mazumder S: Role of calmodulin-calmodulin kinase ii, camp/protein kinase a and erk 1/2 on aeromonas hydrophila-induced apoptosis of head kidney macrophages. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004018.
- 189 Weiß C: Basiswissen medizinische statistik. 2010.
- 190 Consoli A, Formoso G: Do thiazolidinediones still have a role in treatment of type 2 diabetes mellitus? *Diabetes Obes Metab* 2013;15:967-977.
- 191 Smith MR, Manola J, Kaufman DS, George D, Oh WK, Mueller E, Slovin S, Spiegelman B, Small E, Kantoff PW: Rosiglitazone versus placebo for men with prostate carcinoma and a rising serum prostate-specific antigen level after radical prostatectomy and/or radiation therapy. *Cancer* 2004;101:1569-1574.

- 192 Schwartz GK, Weitzman A, O'Reilly E, Brail L, de Alwis DP, Cleverly A, Barile-Thiem B, Vinciguerra V, Budman DR: Phase i and pharmacokinetic study of ly293111, an orally bioavailable ltb4 receptor antagonist, in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2005;23:5365-5373.
- 193 Burstein HJ, Demetri GD, Mueller E, Sarraf P, Spiegelman BM, Winer EP: Use of the peroxisome proliferator-activated receptor (ppar) gamma ligand troglitazone as treatment for refractory breast cancer: A phase ii study. *Breast Cancer Res Treat* 2003;79:391-397.
- 194 Shimazaki N, Togashi N, Hanai M, Isoyama T, Wada K, Fujita T, Fujiwara K, Kurakata S: Anti-tumour activity of cs-7017, a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist of thiazolidinedione class, in human tumour xenografts and a syngeneic tumour implant model. *Eur J Cancer* 2008;44:1734-1743.
- 195 Sawayama H, Ishimoto T, Watanabe M, Yoshida N, Sugihara H, Kurashige J, Hirashima K, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Morita M, Shiose Y, Baba H: Small molecule agonists of ppar- exert therapeutic effects in esophageal cancer. *Cancer Research* 2013;74:575-585.
- 196 Smallridge RC, Copland JA, Brose MS, Wadsworth JT, Houvras Y, Menefee ME, Bible KC, Shah MH, Gramza AW, Klopper JP, Marlow LA, Heckman MG, Von Roemeling R: Efatutazone, an oral ppar-gamma agonist, in combination with paclitaxel in anaplastic thyroid cancer: Results of a multicenter phase 1 trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98:2392-2400.
- 197 Pishvaian MJ, Marshall JL, Wagner AJ, Hwang JJ, Malik S, Cotarla I, Deeken JF, He AR, Daniel H, Halim AB, Zahir H, Copigneaux C, Liu K, Beckman RA, Demetri GD: A phase 1 study of efatutazone, an oral peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, administered to patients with advanced malignancies. *Cancer* 2012;118:5403-5413.
- 198 Boucher E, von Roemeling R, Davidenko I, Hadler D: Pd-0008 - a randomized, placebo-controlled phase 2 study of efatutazone maintenance therapy in patients with advanced colorectal cancer who have achieved disease control following first-line chemotherapy. *ESMO 16th World Congress on Gastrointestinal Cancer, 25–28 June 2014, Barcelona, Spain 2014*
- 199 Komatsu Y, Yoshino T, Yamazaki K, Yuki S, Machida N, Sasaki T, Hyodo I, Yachi Y, Onuma H, Ohtsu A: Phase 1 study of efatutazone, a novel oral peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, in combination with folfiri as second-line therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Invest New Drugs* 2014;32:473-480.
- 200 Söhn M: (naturwissenschaftliche) dissertation. Burgermeister Ca-158, DKFZ-MOST
- 201 Desarzens S, Liao WH, Mammi C, Caprio M, Faresse N: Hsp90 blockers inhibit adipocyte differentiation and fat mass accumulation. *PLoS ONE* 2014;9:e94127.
- 202 Polikandriotis JA, Mazzella LJ, Rupnow HL, Hart CM: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands stimulate endothelial nitric oxide production through distinct peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent mechanisms. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1810-1816.
- 203 Buchner J, Li J: Structure, function and regulation of the hsp90 machinery. *Biomedical Journal* 2013;36:106.
- 204 Picard: Hsp90interactors.Pdf, 2014, 2014,
- 205 Trepel J, Mollapour M, Giaccone G, Neckers L: Targeting the dynamic hsp90 complex in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2010;10:537-549.
- 206 Nicot A-S, Laporte J: Endosomal phosphoinositides and human diseases. *Traffic* 2008;9:1240-1249.
- 207 O'Reilly KE, Rojo F, She QB, Solit D, Mills GB, Smith D, Lane H, Hofmann F, Hicklin DJ, Ludwig DL, Baselga J, Rosen N: Mtor inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates akt. *Cancer Res* 2006;66:1500-1508.
- 208 Engelman JA: Targeting pi3k signalling in cancer: Opportunities, challenges and limitations. *Nature Reviews Cancer* 2009;9:550-562.
- 209 Vilar E, Perez-Garcia J, Tabernero J: Pushing the envelope in the mtor pathway: The second generation of inhibitors. *Molecular Cancer Therapeutics* 2011;10:395-403.

- 210 Tsai MH, Yang YC, Chen KH, Jiang JK, Chou SJ, Chiang TC, Jan HS, Lou MA: Rer and loh association with sporadic colorectal cancer in taiwanese patients. *Hepatogastroenterology* 2002;49:672-677.
- 211 Lin JK, Chang SC, Yang YC, Li AF: Loss of heterozygosity and DNA aneuploidy in colorectal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2003;10:1086-1094.
- 212 R. Melcher TK, H. Luehrs, T. Katzenberger, B. Illert, O. Al-Taie, H. Einsele, W. Scheppach, M. Scheurlen: Prognostic impact of allelic losses in 1p32-36 (hytm1), 4p15.2 (d4s2397), 5q22.2 (d5s346), 8p22 (d8s254), 18q12.3 (d18s474), and microsatellite instability for colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology* 2009;27:15.
- 213 Utada Y, Haga S, Kajiwara T, Kasumi F, Sakamoto G, Nakamura Y, Emi M: Allelic loss at the 8p22 region as a prognostic factor in large and estrogen receptor negative breast carcinomas. *Cancer* 2000;88:1410-1416.
- 214 Tsuneizumi M, Emi M, Hirano A, Utada Y, Tsumagari K, Takahashi K, Kasumi F, Akiyama F, Sakamoto G, Kazui T, Nakamura Y: Association of allelic loss at 8p22 with poor prognosis among breast cancer cases treated with high-dose adjuvant chemotherapy. *Cancer Lett* 2002;180:75-82.
- 215 Matsuyama H, Pan Y, Oba K, Yoshihiro S, Matsuda K, Hagarth L, Kudren D, Naito K, Bergerheim US, Ekman P: The role of chromosome 8p22 deletion for predicting disease progression and pathological staging in prostate cancer. *Aktuelle Urol* 2003;34:247-249.
- 216 Lu T, Hano H, Meng C, Nagatsuma K, Chiba S, Ikegami M: Frequent loss of heterozygosity in two distinct regions, 8p23.1 and 8p22, in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007;13:1090-1097.
- 217 Peng C, Zhang Z, Wu J, Lv Z, Tang J, Xie H, Zhou L, Zheng S: A critical role for zdhhc2 in metastasis and recurrence in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Res Int* 2014;2014:832712.
- 218 Jiang Y, Ben Q, Shen H, Lu W, Zhang Y, Zhu J: Diabetes mellitus and incidence and mortality of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur J Epidemiol* 2011;26:863-876.
- 219 Mills KT, Bellows CF, Hoffman AE, Kelly TN, Gagliardi G: Diabetes mellitus and colorectal cancer prognosis. *Diseases of the Colon & Rectum* 2013;56:1304-1319.
- 220 Aleman JO, Eusebi LH, Ricciardiello L, Patidar K, Sanyal AJ, Holt PR: Mechanisms of obesity-induced gastrointestinal neoplasia. *Gastroenterology* 2014;146:357-373.
- 221 Komninou D, Ayonote A, Richie JP, Jr., Rigas B: Insulin resistance and its contribution to colon carcinogenesis. *Exp Biol Med (Maywood)* 2003;228:396-405.
- 222 Chen L, Kang QH, Chen Y, Zhang YH, Li Q, Xie SQ, Wang CJ: Distinct roles of akt1 in regulating proliferation, migration and invasion in hepg2 and hct 116 cells. *Oncol Rep* 2014;31:737-744.
- 223 Agarwal E, Brattain MG, Chowdhury S: Cell survival and metastasis regulation by akt signaling in colorectal cancer. *Cell Signal* 2013;25:1711-1719.

7 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Weidner, Philip
Geburtsdatum: 17.08.1987
Geburtsort: Heidelberg
Familienstand: Verheiratet, 1 Kind
Vater: Dr. med. Karl Weidner
Mutter: Dr. med. Hedwig Weidner

SCHULISCHER WERDEGANG

1994 – 1998 Nibelungenschule (Grundschule) in Viernheim
1998 – 2007 Albertus-Magnus-Schule (Gymnasium) in Viernheim
29.6.2007 Abitur

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2008/09 Beginn des Studiums (Medizin)
An der Universität Heidelberg
(07.09.2010) 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note *gut*
2010 – 2014 Hauptstudium, Zweiter Abschnitt der
Ärztlichen Prüfung (M2)
10.12.2014 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note *sehr gut*

8 DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde in der II. Medizinischen Klinik des Universitätsklinikums Mannheim unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med Matthias Ebert erstellt. Ihm danke ich für die Förderung und Unterstützung insbesondere bei der Beschaffung der humanen und murinen Gewebeproben sowie für die Möglichkeit das Thema zu bearbeiten.

Frau Dr. rer. nat. Elke Burgermeister danke ich für die ausgezeichnete wissenschaftliche Betreuung, für die Überlassung des Themas, das immer offene Ohr, die Unterstützung und Freiheiten und den immensen Zeitaufwand hinsichtlich der Lösung seltsamer Fragen und abwegiger Ideen. Es ist sicher nicht leicht, Spaß an der Wissenschaft zu vermitteln, Dir ist es gelungen.

Frau Dr. rer. nat. Teresa Friedrich danke ich für die Anleitung und Beaufsichtigung und die endlose Geduld, die sie mir in meiner Arbeit im Labor gegenüber gebracht hat. „Hilft ja nix“ hat durch manches Motivationstief geholfen.

Herrn Prof. Dr. med. Timo Gaiser danke ich für die großartige Unterstützung bei der Beschaffung und Auswertung der Gewebeproben.

Frau Sandra Schneider und Herrn Frank Herweck danke ich für die Unterstützung bei der molekulargenetischen Analyse der humanen und murinen Gewebeproben sowie die Kameradschaft nicht nur während längerer Inkubationszeiten.

Frau Dr. med. Julia Magdeburg und Herrn Prof. Dr. med Peter Kienle danke ich für den Zugang zur CRC-Datenbank der chirurgischen Klinik und die zur Verfügung gestellten Daten zum IGF2 LOI-Status.

Frau Michaela Söhn und Herrn Dr. med. Tobias Gutting danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Forschungsprojekts.

Herrn Prof. Dr. med. Hans-Peter Hammes danke ich für Beratung und Kontaktvermittlung und Frau Dr. rer. nat. Sylvia Katz für die Möglichkeit der Organentnahme der db/db-Mäuse.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Rony Seger danke ich für die Beratung bei der Analyse der erhobenen Daten.

Frau Romina Laegel danke ich für die Unterstützung bei der Suche nach und dem Schneiden der humanen Präparate.

Mein besonderer Dank gilt meiner Frau Maraike für die liebevolle Unterstützung und Kraft, die Du mir in den letzten Jahren gegeben hast.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern für die Unterstützung im Rahmen von Studium und Promotion, ohne die diese Arbeit in dieser Form nicht möglich gewesen wäre.

Dieses Projekt wurde durch folgende Drittmittelförderungen ermöglicht:

Bürgermeister (Ca-158, DKFZ-MOST),

Bürgermeister (#108287, DKH) und

Ebert (SFB 824-TP B1, DFG)